

Die Embryologie des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* (Xiphosura, Chelicerata)
und anderer Arthropoden unter besonderer Berücksichtigung der Neurogenese

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biol. Beate Mittmann

geb. 25.9.1966 in Tübingen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Michael Linscheid

Gutachter/innen: 1. Prof.Dr. Gerhard Scholtz
2. Prof. Dr. Wolfgang Dohle
3. Prof. Dr. Hannelore Hoch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.03.2004

I. EINLEITUNG.....	4
II. MATERIAL UND METHODEN.....	9
II.1 UNTERSUCHUNGSTIERE UND HÄLTERUNG.....	9
II.1.1 <i>Limulus polyphemus</i>	9
II.1.2 <i>Lepisma saccharina</i>	10
II.1.3 <i>Triops cancriformis</i>	11
II.2 CHEMISCHE REAGENZIEN.....	11
II.3 IMMUNHISTOCHEMIE.....	13
II.4 MIKROSKOPIE.....	15
II.4.1 Präparation und Zeichnung.....	15
II.4.2 Lichtmikroskopie.....	15
II.4.3 Konfokale Mikroskopie.....	15
II.4.4 Rasterelektronenmikroskopie.....	15
II.5 STANDARDS UND VERWENDETE ABKÜRZUNGEN.....	15
III. ERGEBNISSE.....	16
III.1 DIE EMBRYONALSTADIEN VON <i>LIMULUS POLYPHEMUS</i> (STAGING).....	16
III.2 DIE FRÜHE NEUROGENESE	31
III.2.1 TRITC-Phalloidin-Markierungen.....	31
III.2.2 α -Tubulin-Markierungen früher Stadien.....	33
III.2.3 TRITC-Phalloidin/Anti-HRP-Doppelmarkierungen.....	33
III.2.4 TRITC-Phalloidin/Anti-PH3-Doppelmarkierungen.....	34
III.3 DER AXONALE VERLAUF DES EMBRYONALEN ZNS VON <i>LIMULUS</i> <i>POLYPHEMUS</i>.....	39
III.4 ANALYSE DER KOPFSEGMENTIERUNG BEI CHELICERATEN UND WEITEREN ARTHROPODEN MITTELS VERSCHIEDENER NEURONALER MARKER	45
III.4.1 <i>Limulus polyphemus</i>	45
III.4.1.1 Der circumoesophageale Neuropilring.....	45

III.4.1.2 Das Stomatogastrische Nervensystem.....	46
III.4.2 <i>Lepisma saccharina</i>	47
III.4.2.1 Der circumoesophageale Neuropilring.....	47
III.4.3 <i>Triops cancriformis</i>	47
III.4.3.1 Der circumoesophageale Neuropilring.....	47
III.4.3.2 Das Stomatogastrische Nervensystem.....	48
III.5 DAS RÄUMLICHE UND ZEITLICHE EXPRESSIONSMUSTER DES HOMÖOBOXGENS <i>DISTAL-LESS</i>.....	52
III.5.1 <i>Limulus polyphemus</i>	52
III.5.1.1 Das Expressionsmuster von <i>Distal-less</i>	52
III.5.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung.....	55
III.5.2 <i>Lepisma saccharina</i>	62
III.5.2.1 Ungewöhnliche Expressionen von <i>Distal-less</i>	62
III.5.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung.....	63
III.5.3 Anti- <i>Distal-less</i> /Anti-Synorfl-Doppelmarkierungen.....	68
III.5.3.1 <i>Limulus polyphemus</i>	68
III.5.3.2 <i>Lepisma saccharina</i>	72
IV. DISKUSSION.....	77
IV.1 DIE FRÜHE NEUROGENESE.....	77
IV.2 KOPFSEGMENTIERUNG.....	88
IV.3 DAS EXPRESSIONSMUSTER VON <i>DISTAL-LESS</i>	94
IV.4 ANTI- <i>DISTAL-LESS</i> /ANTI-SYNORF1-DOPPELMARKIERUNGEN.....	100
V. LITERATUR.....	110
VI. DANKSAGUNG.....	122

I. EINLEITUNG

„The chelicerates are important in the terrestrial fauna. Embryologically, however, these fascinating and successful creatures have not yet received the attention that they merit. We are also still awaiting definitive studies on Xiphosuran embryology.“

Donald Thomas Anderson, 1973

Die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Arthropoden haben bereits Generationen von Wissenschaftlern beschäftigt. Weitgehende Übereinstimmung herrscht hinsichtlich der Monophylie der Arthropoden (unter anderem Boudreaux, 1979a,b, 1987; Lauterbach, 1973, 1980a,b; Paulus, 1979; Weygoldt, 1979; Scholtz *et al.*, 1998; Edecombe *et al.*, 2000; Giribet *et al.*, 2001; Richter, 2002). Noch bis vor wenigen Jahren galt es als relativ gesichert, daß die Myriapoda die nächstverwandte Gruppe zu den Hexapoda sind, wobei lange Zeit strittig war, ob die Myriapoda ihrerseits ein monophyletisches Taxon darstellen (Dohle, 1980; Kraus & Kraus, 1994; Kraus, 1998, 2001). Jüngst erschienene Arbeiten scheinen jedoch die Monophylie der Myriapoda in überzeugender Weise gesichert zu haben (Edgecombe & Giribet, 2002; Giribet *et al.*, 2001). Das gemeinsame Taxon von Hexapoda und Myriapoda wurde als „Tracheata“ oder Antennata bezeichnet (Kraus & Kraus, 1994; Kraus 1998). Deren Schwestergruppe sind wiederum die Crustacea; alle drei Gruppen zusammen bilden das Taxon Mandibulata. Die Schwestergruppe zu den Mandibulata und damit die basale Arthropodengruppe sind die Chelicerata. Diese allgemein weitgehend anerkannten Verwandtschaftsverhältnisse wurden vor einigen Jahren (und bis heute andauernd) durch neue Daten erschüttert und in Frage gestellt. Dies geschah einerseits durch etliche molekulare Untersuchungen (unter anderen Ballard *et al.*, 1992; Friedrich & Tautz, 1995; Boore *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 2001; Giribet *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2001), andererseits durch morphologische Studien (Dohle, 1997, 1998, 2001; Zrzavý & Štys, 1997; Richter 2002). Etliche der molekularen Arbeiten deuteten auf ein Schwestergruppenverhältnis von Myriapoden und Cheliceraten hin (Friedrich & Tautz, 1995; Cook *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2001), allerdings wurden morphologische Merkmale weitgehend oder vollständig außer acht gelassen. Die morphologischen Untersuchungen, die ebenfalls den Vergleich von Genexpressionsmustern beinhalteten, legen eine monophyletische Einheit von Crustacea und Hexapoda nahe (Dohle, 1997, 1998, 2001; Zrzavý & Štys, 1997; Richter 2002). Zrzavý und Štys (1997) gaben dieser Einheit den Namen „Pancrustacea“, doch wurde es von Dohle (2001) aufgrund der übereinstimmenden Kristallkegelstrukturen in „Tetraconata“ umbenannt. Nach wie vor werden mit mehr oder weniger überzeugenden Daten alle erdenklichen Schwestergruppenverhältnisse deklariert (zusammengefaßt bei Richter, 2002), jedoch wird auch immer ernsthafter versucht, durch die Kombination möglichst zahlreicher und möglichst vielfältiger Merkmale überzeugende Hypothesen aufzustellen.

Ein Merkmal, das für die vergleichenden Untersuchungen häufig herangezogen wird, ist die Neurogenese, denn sie gilt in der Regel als konservatives Merkmal. Hinsichtlich der Neurogenese zeigen sich interessante Übereinstimmungen zwischen einigen Crustaceengruppen und den Hexapoden, denn in beiden Fällen wird das Zentralnervensystem über Neuroblasten gebildet, d.h. über neuronale Stammzellen im

ventralen Neuroektoderm, die über eine inäquale Teilung Gangliennutterzellen hervorbringen, aus denen sich im weiteren Neurone oder auch Gliazellen bilden (u.a. Dohle & Scholtz, 1988; Scholtz, 1990, 1992; Harzsch & Dawirs, 1994; Pasakony, 1994; Gerberding, 1997). Dieser Modus wird „Stammzellenmodus“ – „stem cell mode“ – genannt (Stent, 1985, 1998). Die Neurogenese der bislang untersuchten Myriapoden verläuft nach einem anderen Modus (Anderson, 1973; Weygoldt, 1985; Whittington *et al.*, 1991; Dohle, 1964, 1997; Dove & Stollewerk, 2003). Neuroblasten im engeren Sinne wurden bislang nicht festgestellt (Heymons, 1901; Tiegs, 1940, 1947; Dohle, 1997, 2001; Dove & Stollewerk, 2003). Nur *Scutigera* wurde die Entwicklung von Neuroblasten nachgesagt (Knoll, 1974), was jedoch durch Nachuntersuchungen nicht bestätigt werden konnte (Dohle, 1980).

Somit kann der Stammzellenmodus unter Voraussetzung der Homologie von Hexapoden- und Crustaceenneuroblasten als gemeinsames Merkmal gewertet werden. Es bestehen jedoch auch einige Unterschiede zwischen den Neuroblasten beider Klassen (Doe & Goodman, 1985a,b; Dohle & Scholtz, 1988; Scholtz, 1992), so daß eine abschließende Klärung der Frage erst durch zusätzliche Untersuchungen weiterer Taxa zu erwarten ist.

Allerdings kann die Frage, ob der Stammzellenmodus der Neurogenese als apomorphes Merkmal für die Tetraconata zählen kann, erst beantwortet werden, wenn ausgeschlossen werden kann, daß auch die Chelicerata ihr ZNS über (homologe) Neuroblasten bilden (Mittmann, 2002). Entwickeln die Chelicerata ebenfalls Neuroblasten, liegt die Vermutung nahe, daß der Stammzellenmodus ein ursprüngliches Arthropodenmerkmal darstellt und somit ein plesiomorphes Merkmal für Hexapoda und Crustacea wäre.

Die Neurogenese von Cheliceraten hat bislang bei weitem nicht soviel Beachtung gefunden wie die von Hexapoden oder Crustaceen. Anderson (1973) beschreibt einen allgemeinen Modus für Xiphosuren, Skorpione (mit wenigen Ausnahmen) und Arachniden. Nach diesem Modus proliferieren Zellen des ventralen Neuroektoderms ins Innere des Embryos und bilden dort segmentale Verdickungen. Weygoldt (1985) findet bei Pseudoskorpionen paarige Invaginationen, von denen jede ein sich entwickelndes Ganglion darstellt. Bei Amblypygi wird laut Weygoldt (1985) jedes Neuomer von zahlreichen Invaginationen gebildet. Zellen, die rasch proliferieren, bilden kleine Cluster, die wiederum invaginieren. Diese Zellen teilen sich weiter, während die innersten bereits Neurone differenzieren und Axone ausbilden. Aus diesem Grunde findet man an einem Ende des Neuomers proliferierende Zellen, während am anderen Ende, im Inneren des Embryos, bereits Axone auswachsen und die Konnektive und Kommissuren gebildet werden. Auch die Existenz von Neuroblasten wird berichtet, insgesamt für drei Arten. Einerseits für einen Vertreter der Pycnogonida (Winter, 1980, was wegen der zahlreichen ursprünglichen Merkmale dieser Gruppe hochinteressant wäre. Andererseits sollen noch ein Skorpion der Gattung *Heterometrus* (Mathew, 1956) sowie ein Vertreter der Spinnengattung *Heptathela* (Yoshikura, 1955) Neuroblasten entwickeln. In allen drei Fällen sind jedoch Fehlinterpretationen oder die Verwendung einer unterschiedlichen Definition des Begriffs „Neuroblasten“ nicht unwahrscheinlich. Eine Nachuntersuchung wäre wünschenswert.

In jüngster Zeit befaßten sich einige Studien mit der Frage des Neurogenesemodus bei Cheliceraten (Stollewerk, 2002; Stollewerk *et al.*, 2001, 2003; Mittmann, 2002). In einem

Fall wurden Vertreter der Araneae, *Cupiennius salei* und *Pholcus phalangioides*, untersucht (Stollewerk, 2002; Stollewerk *et al.*, 2001, 2003), im anderen Fall als Vertreter der Xiphosuren der Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* (Mittmann, 2002). In beiden Fällen zeigen die neurogenetischen Zellen des ventralen Neuroektoderms keinerlei neuroblastenspezifischen Teilungsmodus und weisen auch ansonsten etliche Unterschiede auf (siehe Abschnitt III.2).

Für *Limulus polyphemus* lagen bislang nur sehr unterschiedliche Angaben hinsichtlich des Neurogenesemodus vor. Neben der allgemeinen Beschreibung von Anderson (1973) finden wir eine Beschreibung zahlreicher runder Gruben, die als Cluster schnell proliferierender Zellen gedeutet wurden (Kingsley, 1893). Patten (1889, 1893, 1912) vermutete, daß diese Cluster „Sinnesorgane“, sogenannte Ventralorgane seien. Da keine genaueren Daten zur Verfügung standen, habe ich einen umfangreichen Abschnitt der vorliegenden Arbeit der Untersuchung des Neurogenesemodus bei *Limulus polyphemus* gewidmet. Die insbesondere bei *Cupiennius salei* erhobenen Daten liefern bereits einen Hinweis, daß sich die Neurogenese bei Cheliceraten anders vollzieht als bei Hexapoden und Crustaceen. Das neurogenetische Grundmuster für die Chelicerata können wir jedoch mit einiger Sicherheit nur über die Untersuchung eines Vertreters mit zahlreichen ursprünglichen Merkmalen herausfinden. Die Xiphosuren stellen nun als sogenannte „lebende Fossilien“, deren Wurzeln mindestens bis ins Silur zurückreichen, diejenigen rezenten Cheliceratenvertreter mit der möglicherweise ursprünglichsten Embryonalentwicklung dar (Anderson, 1973) und sind damit für die vorliegende Fragestellung sehr geeignet.

Embryologische Studien an Xiphosuren sind rar, und etliche reichen in das vorletzte Jahrhundert zurück (beispielsweise Kingsley, 1890, 1892, 1893; Johansson, 1933; Scholl, 1977; Brown & Clapper, 1981; Sekiguchi *et al.*, 1982; Sekiguchi, 1988). Deshalb stellt nahezu jede embryologische Untersuchung an Pfeilschwanzkrebsen Neuland dar. Sekiguchi (1982) sowie Brown und Clapper (1981) haben den Versuch einer Stadienfestlegung unternommen. Eine zuverlässige Stadienbeschreibung ist die Grundlage für die Analyse und den Vergleich entwicklungsgenetischer Daten. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Neuuntersuchung der Entwicklung und eine Neueinteilung der Embryonalstadien vorgenommen. Soweit möglich, wurden die beiden genannten Arbeiten miteinbezogen.

Bislang wurden die meisten Untersuchungen des Nervensystems an adulten Tieren durchgeführt (Patten & Redenbaugh, 1899; Packard, 1873; Hanström, 1928). Aber das adulte Nervensystem der Pfeilschwanzkrebse weist zahlreiche Fusionen auf, die vergleichende Untersuchungen sehr erschweren. Auch rät uns das von Ernst Haeckel entdeckte Biogenetische Grundgesetz die Untersuchung der Embryonalentwicklung – „Die Keimesgeschichte ist ein Auszug aus der Stammesgeschichte. Die Phylogenese ist die mechanische Ursache der Ontogenese; oder ausführlicher: Die Formenreihe, welche der individuelle Organismus während seiner Entwicklung von der Eizelle an bis zu seinem ausgebildeten Zustand durchläuft, ist eine kurze, gedrängte Wiederholung der langen Formenreihe, welche die tierischen Vorfahren desselben Organismus oder die Stammformen seiner Art von den ältesten Zeiten der sogenannten organischen Schöpfung an bis auf die Gegenwart durchlaufen haben“ (1866/ 1906, 1909, 1910) –, denn wenn sich noch Zeugnisse für die Existenz eines evolutionär später reduzierten oder veränderten

Organs finden lassen, dann wird dies während der Ontogenese der Fall sein. Dieser Gedanke spielt insbesondere bei der Frage nach Segmenthomologien im Arthropodenkopf eine Rolle. Um hier weitere Erkenntnisse zu gewinnen, wurde die Gehirnentwicklung und die Modifizierung des zugehörigen Axonskeletts in *Limulus polyphemus*, dem Notostraken *Triops cancriformis* und dem Silberfischchen *Lepisma saccharina* untersucht (Mittmann & Scholtz, 2003).

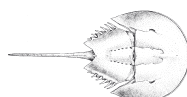
Die Homologieverhältnisse im Arthropodenkopf sind seit mehr als einem Jahrhundert sehr umstritten. Da die Cheliceraten keinen Kopf im eigentlichen Sinne haben, ist es schwierig, ihre prosomalen Segmente mit den Segmenten im Kopf von Crustaceen, Hexapoden und Myriapoden zu homologisieren. Das Prosoma besteht aus mehr Segmenten als der morphologisch, funktionell und embryologisch eindeutig definierte Mandibulatenkopf. Bei allen Arthropoden innerviert das Protocerebrum, der anteriorste Teil des Gehirns, den optischen Apparat. Über die Homologie dieses Gehirnabschnittes aller vier Arthropodengruppen besteht im allgemeinen Einigkeit. Den Stein des Anstoßes liefert vielmehr die Innervierung des nächstfolgenden Anhangspaares, der Chelicere bei den Cheliceraten und der (ersten) Antenne der Mandibulata. Die (erste) Antenne wird vom Deutocerebrum innerviert, wohingegen das nächstfolgende Segment (die zweite Antenne bei Crustaceen und das anhangslose Interkalarsegment bei „Tracheata“) vom Tritocerebrum innerviert wird. Bei Hexapoden und Myriapoden verschmilzt das Tritocerebrum während der Embryonalentwicklung mit dem Deutocerebrum. Bei Cheliceraten wird im allgemeinen angenommen, daß das deutocerebrale Segment vollständig verlorengegangen ist, einschließlich aller dazugehörigen Gehirnbereiche; alternativ könne es auch mit dem Protocerebrum verschmolzen sein (Hanström, 1928; Siewing, 1963; Weygoldt, 1985; Gruner, 1993). Das Chelicerensegment soll homolog zum tritocerebralen Segment (zweite Antenne, Interkalarsegment) der Mandibulaten sein (u.a. Wegerhoff & Breidbach, 1995). Betrachtet man jedoch die entsprechende Literatur, so scheinen die Daten häufig theoriebeladen oder auch durch die Vorannahme einer Reduktion des deutocerebralen Segments voreingenommen zu sein (Mittmann & Scholtz, 2003). Bislang waren die Versuche, in Coelomhöhlen (Pross, 1966, 1977) oder transienten Neuromeren (Pross, 1966, 1977; Winter, 1980), in Antennenglomeruli (Gruner, 1993) oder Antennenganglien (Johansson, 1933; Scholl, 1977) Zeugnisse für ein ehemaliges Deutocerebrum zu finden, mehr oder weniger überzeugend. Doch kürzlich wurde die traditionelle Sichtweise durch einige Studien in Frage gestellt, die die Expression von Hox-Genen und von Segmentierungs-Genen in Cheliceraten untersucht haben (Telford & Thomas, 1998; Damen *et al.*, 1998; Damen, 2002). Die Ergebnisse bestätigten die alte, selten beachtete Ansicht, daß das Deutocerebrum der Cheliceraten keineswegs reduziert ist, sondern zum Chelicerensegment gehört (Viallanes, 1893; Goodrich, 1897).

Die beiden Hauptargumente für eine tritocerebrale Innervierung der Chelicere beziehen sich auf die poststomodaeale Kommissur und die Verbindung zum Stomatogastrischen Nervensystem. Die Gehirnentwicklung bei *Limulus polyphemus* und der Vergleich mit anderen Arthropoden geben weiteren Einblick in diese Frage und liefert einen morphologischen Beweis für eine segmentale Homologie zwischen der Chelicere und der ersten Antenne der Mandibulata (Mittmann & Scholtz, 2003).

Um darüber hinaus eine Grundlage für weitere Studien zu schaffen, wurden neben der frühen Neurogenese respektive dem Neurogenesemodus und der Gehirnentwicklung, die für die Frage der segmentalen Homologien innerhalb des Arthropoden“kopfes“ eine entscheidende Rolle spielt, auch die Zwischenschritte, d.h. der Verlauf der Axogenese, die embryonale Struktur des Strickleiternnervensystems und die Innervierung der Anhänge, beschrieben. Diese Daten liefern einen ersten Einblick in die genannten Embryonalstrukturen, sie sind jedoch unvollständig und ausbaufähig, beispielsweise durch die Verwendung weiterer Techniken wie Einzelzellmarkierungen, die die Untersuchung genauer Projektionsrichtungen einzelner Axone erlauben. Der entsprechende Abschnitt wird deshalb in erster Linie als Anregung für weitere Studien betrachtet. Die Kenntnis der Axogenese kann wiederum einen weiteren Merkmalskomplex für vergleichende Untersuchungen liefern, denn es liegen diesbezüglich bereits von Hexapoden und Myriapoden Daten vor (unter anderen Sink & Whittington, 1991; Whittington, 1996, Whittington *et al.*, 1991, 1996; Whittington & Bacon, 1998; Boyan *et al.*, 1995, 2003; Reichert & Boyan, 1997). Die enorme Kleinheit der Zellen von *Limulus polyphemus* stellen dafür allerdings ein Hindernis dar, das erst überwunden werden muß.

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit habe ich mich mit den neuronalen Aspekten des Homöobox-Gens *Distal-less* (*Dll*) befaßt. Zahlreiche Arbeiten liegen über die extremitätenspezifische Funktion des Gens in Arthropoden vor, ein Aspekt, der hier nur am Rande behandelt werden soll. Aber *Dll* ist auch an der Ausbildung des ZNS beteiligt, was bereits von zahlreichen Autoren als Nebenbemerkung erwähnt wurde (Panganiban *et al.*, 1997; Mittmann & Scholtz, 2001; Williams *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist das Gen jedoch auch an der Ausbildung von Mechano- und Chemorezeptoren beteiligt (Mittmann & Scholtz, 2001; Williams *et al.*, 2001). Einige Daten scheinen darauf hinzudeuten, daß *Dll* ebenfalls in Gliazellen aktiv ist (Panganiban & Rubinstein, 2002). Um genauere Kenntnisse über die neuronale Ausbreitung von *Dll* zu bekommen, habe ich mittels verschiedener Ansätze die Embryonen mehrerer Arthropodentaxa hinsichtlich ihres räumlichen und zeitlichen *Dll*-Expressionsmusters untersucht. In einem Ansatz wurde das Zellschicksal der Bereiche, die eine extremitätenuntypische *Dll*-Expression zeigten, untersucht. Die rasterelektronen-mikroskopischen Untersuchungen ergaben eine verblüffende Korrelation zwischen der Position von Mechano- und Chemorezeptoren und embryonaler *Dll*-Expression (Mittmann & Scholtz, 2001).

In einem anderen Ansatz wurden Doppelmarkierungen von *Dll* und einem neurospezifischen Marker (Synorfl gegen *Drosophila*-synapsin) vorgenommen und die Expressionsmuster verschiedener Arthropoden, insbesondere von *Limulus polyphemus* und *Lepisma saccharina*, verglichen. So war es möglich, eine *Dll*-Expression in Gliazellen von *Lepisma saccharina* mit äußerster Sicherheit nachzuweisen. Auch im zentralen und peripheren Nervensystem von *Limulus polyphemus* scheint die *Dll*-Aktivität in Gliazellen durchaus wahrscheinlich.



II. MATERIAL UND METHODEN

II.1 UNTERSUCHUNGSTIERE UND HALTERUNG

II.1.1 *Limulus polyphemus*

Die Eier von *Limulus polyphemus* wurden in der Nähe des Marine Biological Laboratory (MBL) in Woods Hole (Massachusetts, USA) gesammelt. Insbesondere in Vollmond- und Neumondnächten, aber auch während des Tages kommen die Tiere in Paaren an die Strände (Abb. 1), wo sie während der höchsten Flut am Spülsaum die Eier in ca. 10 cm tiefe Löcher legen. Das Weibchen gräbt mit dem letzten Laufbeinpaar das Loch und legt die Eier hinein, das Männchen gibt das Sperma darüber; dann bewegen sie sich einige Zentimeter vorwärts und wiederholen den Vorgang. Die alte Mulde wird durch die seichten Wellen am Spülsaum sofort mit Sand bedeckt. An einer Stelle werden ca. 3-5 dieser Eipakete mit jeweils ungefähr 500 bis 1000 Eiern abgelegt, dann sucht sich das Paar eine neue Stelle am Strand. Da die Befruchtung nach spätestens 1-5 min erfolgt ist (Sekiguchi, 1988), kann man die Eier direkt ausgraben, nachdem das Pärchen die Niststelle verlassen hat. Die Eier sind meist rund bis oval und haben einen Durchmesser von ca. 1,5-2 mm; sie können jedoch auch durch das enge Zusammendrücken im mit Eiern übervollen Panzer des Weibchens rechteckig oder fast flach und völlig unförmig zerdrückt sein. Die Form des Eies hat keinerlei Einfluß auf die Entwicklung, auch wenn die Keimstreifen in den „zerknautschten“ Exemplaren eine eigentümliche Lage einnehmen können. Die Eier zeigen eine weite farbliche Varianz von blau über grau, grün, rosé, weiß und braun (Abb. 2). Sie sind von einem klebrigen Sekret umgeben, so daß sie fest aneinander haften und von einer Schicht kleiner Sandkörner umhüllt sind. Die Eier wurden mit Hilfe einer Federstahlpinzette separiert und weitgehend von allen Sandkörnern befreit, damit die Embryonalentwicklung durch die transparenten Eihüllen beobachtet werden kann. Je 100 Eier wurden in einer Zellkulturschale von 10 cm Durchmesser mit frischem Meerwasser aufbewahrt und das Wasser während der ersten zwei Wochen täglich, danach mindestens wöchentlich gewechselt. Während der ersten 14 Tage der Entwicklung wurden alle Eier täglich kontrolliert, offenbar unbefruchtete oder von Pilzen oder anderen Keimen befallene Exemplare verworfen; insbesondere Pilze und Algen befallen ansonsten sehr schnell auch die restlichen Eier in einer Zellkulturschale; im Handel erhältliche Fungizide oder auch die Behandlung mit Nipagin zeigten keine Wirkung, weder auf die Pilze noch auf die sich entwickelnden Eier. Die Halterungstemperatur lag während der ersten Entwicklungsschritte zwischen 15 und 25 °C, danach wurden die Eier im Kühlschrank bei 4-6 °C aufbewahrt. Diese tiefen Temperaturen verlangsamten die Entwicklung extrem. Werden die Eier sofort nach der Befruchtung bei 4-6 °C gehältert, entwickeln sich ca. 95 % der Eier überhaupt nicht, die restlichen 5 % zeigen Fehlentwicklungen. Offenbar sind die ersten Entwicklungsschritte gegen Temperaturschwankungen sehr empfindlich, ab ca. 15 °C ist die Entwicklung erheblich verlangsamt (siehe auch III.), es treten jedoch nicht mehr Fehlentwicklungen auf als bei höheren Temperaturen. Entgegen populären Angaben, daß die Eier mühelos ca. ein Jahr bei 4-6 °C gehalten werden können, traten bei meinen

Untersuchungen in allen drei Jahren nach ca. 6 Monaten massive Fehlentwicklungen auf, die eine weitere Untersuchung der Embryonalentwicklung unmöglich machten.

Die Embryonen wurden in Limulus-Ringerlösung präpariert. Dies gestaltet sich insbesondere in den sehr frühen Stadien problematisch, da das Chorion äußerst zäh und darüber hinaus elastisch ist, so daß ein erheblicher Druck mittels der scharf geschliffenen Insektennadel aufgewendet werden muß, um auch nur ein Loch hineinzubekommen. Sehr oft durchstößt man dabei auch die inneren Embryonalhüllen, der Dotter quillt durch den inneren Druck im Ei schwallartig hervor, und dabei wird der aus nur wenigen Zellschichten bestehende Embryo verformt oder sogar zerrissen. Aus diesem Grunde wurde das Ei immer an der dem Embryo gegenüberliegenden Seite angestochen. Das Loch wurde mit Hilfe von Insektennadeln und Pinzetten erweitert und nach und nach das Chorion entfernt. Anschließend wurde die innere, netzförmig skulpturierte Embryonalhülle ebenfalls mit Hilfe einer Nadel angestochen und nach und nach entfernt. Der Dotter wurde vollständig von der Dorsalseite des Embryos mittels der Nadeln entfernt und der Embryo in PEM-FA oder Paraformaldehydlösung (3,7 %) überführt. Die Fixierungszeit betrug zwischen 15 min und 1 h. Die präparierten Embryonen, die nicht sofort weiterverarbeitet wurden, wurden in 100 % MeOH überführt und bei -18 °C aufbewahrt. Das MeOH wurde vor der immunhistochemischen Färbung in multiplen Waschschritten mit PBS (1x) aus dem Gewebe herausgewaschen.

II.1.2 *Lepisma saccharina*

Das kosmopolite Silberfischchen *Lepisma saccharina* ist in China bereits seit 3000 v. u. Z. bekannt. Ungefähr 200 Tiere wurden in einer Plastikbox (15 x 11,6 x 7,2 cm), die mit zweilagigen Zellstofftüchern ausgelegt war, gehalten. Das Futter bestand aus einer Mischung aus 70 % Weizenmehl, 20 % Haferflocken und 10 % Fischfutter in Flocken. Es wurde alle 3-4 Tage ausgetauscht. Gegen Schimmelbildung half ein Auswischen der Boxen mit Nipaginlösung. Gegen den unausweichlichen Befall mit Milben wurden die Boxen regelmäßig alle 2 Monate gewechselt. Die Zuchttemperatur betrug ± 23 °C (Zimmertemperatur mit gewöhnlichen Schwankungen). Um eine dauerhafte konstante Luftfeuchtigkeit zu erhalten, wurde in den Boxen eine halbe Petrischale aus Plastik aufgestellt, die mit zusammengepreßten, nassen Zellstofftüchern ausgelegt war. Diese wurden alle 5 Tage angefeuchtet und alle 4 Wochen durch frische Tücher ersetzt, um einer Schimmelbildung vorzubeugen.

Die Eiablage erfolgte während des gesamten Beobachtungszeitraumes, wobei ein deutlicher Rückgang in den Wintermonaten Dezember bis Februar zu bemerken ist, auch wenn die Tiere keinen sonderlichen Temperaturschwankungen ausgesetzt sind. Eine völlige Stagnation der Eiablage aufgrund eines endogenen Rhythmus, wie sie von Sarhage (1954) für die Monate September bis April behauptet wird, konnte nicht bestätigt werden. Im Dezember bis Februar wurden pro Box ca. 1-15 bis 15 Eier abgelegt, während man in den restlichen Monaten zwischen 20-90 Eier täglich in den Boxen finden konnte. Die Weibchen legen die anfangs fast flüssigen Eier zwischen die zwei Zellstofflagen, wo man sie nach ihrer Aushärtung, die eine orange-bräunliche Färbung mit sich bringt, leicht sehen und isolieren konnte. Die Eier sind oval und ca. 1 mm lang. Ihre Form kann jedoch

erheblich variieren, weil das Chorion bei der Eiablage unausgehärtet und sehr empfindlich ist und sich bei der rasch erfolgenden Verfestigung seiner Umgebung anpaßt. Die Boxen wurden täglich nach Eiern untersucht, diese entfernt und in einer weiteren Plastikbox unter identischen Bedingungen bis zur Präparation gelagert.

Für die Präparation der Eier wurden wegen des stabilen Chorions Insektennadeln der Stärke 00 verwendet. Die Eier wurden in Ringerlösung überführt und möglichst alle anhaftenden Zellstoffäden entfernt. Die Embryonen liegen im allgemeinen längsorientiert im Ei, können je nach Eiform jedoch auch schräg auf der Dottermasse liegen. Sehr frühe Stadien wurden direkt in PEM-FA oder in Paraformaldehydlösung (3,7 %) präpariert, ältere Stadien wurden in Ringerlösung präpariert und erst anschließend in PEM-FA oder Paraformaldehydlösung (3,7 %) überführt. Zur Präparation wurde mittels der Nadeln ein Loch in das Chorion gerissen, dieses so weit wie möglich vergrößert und der Embryo mittels einer sanften Strömung, die mit einer Pasteurpipette erzeugt wurde, herausgeschwemmt. Die Fixierungszeit betrug zwischen 20 min für frühe Stadien und 45 min für späte Stadien. Die Stadieneinteilung in dieser Arbeit wird von Mittmann (1998; 2000) übernommen.

II.1.3 *Triops cancriformis*

Mit Dauereiern versetzter Sand wurde in ein mit destilliertem Wasser und einigen Algen gefülltes Aquarium überführt. Die Nauplien schlüpfen nach ca. 2 Tagen und entwickeln sich sehr rasch. Die Krebse wurden mit Fischfutter, Nudeln, geraspelter Mohrrübe und Salat gefüttert. Ab einer Größe von ca. 2 cm beginnen sie mit der Ablage von Eipaketen vor jeder Häutung. Der mit Eiern versetzte Sand wurde ohne Trockenphase in ein Becken mit Wasser (1 : 5 ursprüngliches Aquariumwasser : frisches destilliertes Wasser) überführt. Wiederum nach ca. 2 Tagen schlüpfte die neue Nauplius-Generation. Die Schlupfrate war bei Auslassen der Trockenphase erheblich höher als unter Einhaltung derselben. Die verschiedenen Naupliusstadien wurden direkt in PEM-FA überführt, an der Dorsalseite mit Hilfe von zwei Minutiennadeln geöffnet und der Dotter entfernt. Die Fixierungszeit betrug 15-20 min. Die fixierten Nauplien wurden in MeOH (100 %) überführt und bei -18 °C gelagert.

II.2 CHEMISCHE REAGENZIEN

II.2.1 *Limulus*-Ringer

430 mmol/l NaCl, 9,56 mmol/l KCl, 9,52 mmol/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9,97 mmol/l $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 21,95 mmol/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 M/l HEPES, 1 M/l TES wurden gemischt und für mindestens 30 min mittels Stirrer verrührt. Der pH-Wert wurde vorsichtig auf 7,4 eingestellt; die Ringerlösung ist sehr labil und muß mindestens jede Woche auf ihren pH-Wert kontrolliert werden. Gelagert wird sie im Kühlschrank bei 4 °C.

II.2.2 Lepisma-Ringer

115 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l KCL, 2,15 mmol/l Na₂HPO₄, 0,85 mmol/l NaH₂PO₄, 1,8 mmol/l CaCl₂.

II.2.3 PBS (10x)

18,6 mmol/l NaH₂PO₄, 81,4 mmol/l Na₂HPO₄, 1750 mmol/l NaCl wurden gemischt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4 °C aufbewahrt und der pH-Wert einmal in der Woche gemessen.

II.2.4 PBS (1x)

Das zehnfach konzentrierte PBS wurde 1:10 mit destilliertem Wasser gemischt und der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls wiederum auf 7,4 eingestellt.

II.2.5 PBT

PBS (1x), 0,1 % Triton X-100 und 0,3 % BSA (Bovine Serum Albumine Fraction V, >96 %, Roth) wurden bei Zimmertemperatur mit Hilfe eines Stirrers so lange vermischt, bis alles BSA gelöst war. Anschließend wurde der pH-Wert gemessen und auf 7,4 eingestellt. Das PBT wurde in Eppendorfgefäße pipettiert und bei -18 °C aufbewahrt.

II.2.6 PBT+N

PBT wurde mit 5 % Normal Goat Serum (Roth) vermischt und anschließend gefiltert, um der Lösung die letzten flockigen Serumreste zu entziehen. Die Lösung wurde in Eppendorfgefäße pipettiert und bei -18 °C aufbewahrt.

II.2.7 PEM-FA

0,1 mol/l PIPES (C₈H₁₈N₂O₆S₂, Roth), 2 mmol/l EGTA (Ethylenglycol-bis-[β-Aminoethyl Ether] N,N,N',N'-Tetraacetic Acid), 1 mmol/l MgSO₄ wurden in 100 ml NaOH-Lösung (1g/20g H₂O) gelöst (pH-Wert ungefähr 11,15). Der pH-Wert wurde auf 6,95 eingestellt. Diese Lösung wurde kurz vor der Verwendung mit Paraformaldehydlösung (37 %) in einem Verhältnis von 9:1 gemischt.

II.2.8 Paraformaldehyd (37 %, 3,7 %)

3,7 g Paraformaldehyd (Roth) wurde mit 10 ml destilliertem Wasser und 140 µl 1N NaOH unter dem Abzug in einem mit Parafilm verschlossenen Zylinder schnell erhitzt, bis der pH-Wert auf ca. 7,0 abfällt und die Lösung vollständig klar ist. Der pH-Wert kann allerdings je nach Wasserqualität sehr schwanken und muß auf 7,0 bis 7,4 eingestellt werden. Die Lösung wurde bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C aufbewahrt und mindestens einmal wöchentlich frisch zubereitet.

Zur Fixierung der Embryonen wurde die Paraformaldehydlösung 1:10 mit PBS (1x) vermischt.

II.2.9 DAB

1 mg/ml DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) wurde in PBS (1x) gelöst, in Eppendorfgefäßen bei -18 °C aufbewahrt und bei Bedarf im Dunklen aufgetaut.

II.2.10 Glycerol

Eine 70 %ige Glycerollösung wurde mit destilliertem Wasser und Glycerol höchster Reinheitsqualität erstellt und bei 4 °C aufbewahrt.

II.2.11 Bouin

Eine Bouinlösung wurde nach Romeis (1989) erstellt und bei 4 °C aufbewahrt.

II.2.12 Nipagin

1,6 g Nipagin wurden in 10 ml EtOH (98 %) gelöst und mit 1 l destilliertem Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde zwei Tage in einem unverschlossenen Gefäß bei Zimmertemperatur stehen gelassen und mehrmals täglich umgerührt, damit das EtOH verdunsten konnte.

II.3 IMMUNHISTOCHEMIE

Da der Ablauf der immunhistochemischen Färbungen für alle Antikörper identisch war, wird im weiteren der Vorgang nur einmal beschrieben und im Anschluß die Konzentrationen (Tabelle 1) sowie die unterschiedlichen Inkubationszeiten der verschiedenen primären und sekundären Antikörper angegeben.

Die fixierten Embryonen wurden dreimal 5 min in PBS (1x), dreimal 5 min in PBT, dreimal 30 min in PBT und zweimal 30 min in PBT+N gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen über Nacht im primären Antikörper bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Embryonen dreimal 5 min und viermal 30 min in PBT gewaschen, anschließend wiederum zweimal 30 min in PBT+N gewaschen und über Nacht bei 4 °C im sekundären Antikörper inkubiert. Die inkubierten Embryonen wurden dreimal 5 min und viermal 30 min in PBS (1x) oder PBT gewaschen.

War der sekundäre Antikörper Peroxidase-konjugiert, so wurden die Embryonen für 10 – 15 min in 300 µl DAB-Lösung überführt. Anschließend wurden 3 µl 3 %ige H₂O₂-Lösung dazu pipettiert und die Embryonen je nach Färbegrad zwischen 10 min und 2 h darin gelassen. Diese Reaktion wurde durch die Überführung der Embryonen in PBS gestoppt. Die Embryonen wurden mit Hoechst (Bisbenzimid) 10-30 min gefärbt und anschließend nochmals 10 min in PBS überführt.

Die Schritte des letzten Abschnittes entfielen bei fluoreszenten sekundären Antikörpern. Bei diesen betrug die Inkubationszeit 1-4 h bei Zimmertemperatur.

Bei Doppelmarkierungen, beispielsweise *Dll*/Synorfl, wurden beide primären Antikörper gleichzeitig im ersten Inkubationsschritt verwendet, die beiden sekundären im zweiten Inkubationsschritt ebenfalls.

Für die Phalloidin-Färbungen wurde TRITC-konjugiertes Phalloidin (Sigma) verwendet. Die Embryonen wurden nach der Fixierung dreimal 5 min und viermal 30 min in PBS (1x) gewaschen. Alle weiteren Färbe- und Waschvorgänge wurden im Dunklen vorgenommen.

Die Embryonen wurden in TRITC-Phalloidin (2 µg/ml PBS) für 1,25 h bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie mindestens dreimal 5 min und viermal 30 min in PBS (1x) gewaschen; die Auswaschphase wurde teilweise unter häufigem Wechseln des PBS bis zu 12 h ausgedehnt. Anschließend wurden die Embryonen in Glycerol auf einen Objektträger montiert und bei 4 °C aufbewahrt.

Bei den Doppelmarkierungen mit TRITC-Phalloidin und Anti-HRP respektive Anti-PH3 wurden zuerst die Antikörperfärbungen vorgenommen, die Phalloidinmarkierung jedoch erst während der 30minütigen PBS-Waschschritte des Antikörperfärbungsablaufs.

Alle gefärbten Embryonen wurden in Glycerol auf einem Objektträger in die gewünschte Lage gebracht und mit einem Deckgläschen fixiert. Die Präparate wurden im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

	Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
<i>Distal-less</i>	1µg/ml PBT+N	Peroxidase-konjugiert Goat-Anti-Rabbit (Jackson Immunoresearch): 1:800 in PBT+N
	1µg/ml PBT+N	Alexa Fluor 488 Goat-Anti-Rabbit (Molecular Probes): 1µg/ml PBT+N
Acetyliertes α-Tubulin (Sigma)	1:100 in PBT+N	Cy-3 konjugiert (543) Goat-Anti-Mouse (Sigma): 1:200 in PBT+N
Synorfl	1:10 in PBT+N	Peroxidase-konjugiert Goat-Anti-Mouse (Jackson Immunoresearch): 1:100 in PBT+N
		Cy-3 konjugiert (543) Goat-Anti-Mouse (Sigma): 1:200 in PBT+N
Anti-HRP (Rabbit, Jackson Immunoresearch)	1:50 in PBT+N	Alexa Fluor 488 Goat-Anti-Rabbit (Molecular Probes): 1:500-2000 in PBT+N
Anti PH-3 (Upstate Biotech)		Alexa Fluor 488 Goat-Anti-Rabbit (Molecular Probes): 1:500-2000 in PBT+N

Tabelle 1. Primäre und sekundäre Antikörper und ihre Konzentrationen.

II.4 MIKROSKOPIE

II.4.1 Präparation und Zeichnung

Zur Präparation der Embryonen wurde ein Stemi 2000 (Zeiss) verwendet, zur Zeichnung der verschiedenen Stadien ein Stemi SV (Zeiss) mit Camera lucida. Hierfür wurden die Embryonen von *Limulus polyphemus* in PEM-FA oder in Paraformaldehydlösung (3,7 %) 10 min fixiert, in basischem Fuchsin (5 %) 5 min gefärbt und anschließend gezeichnet. Überschüssiges Fuchsin wurde durch kurzes Waschen in EtOH (70 %) entfernt.

II.4.2 Lichtmikroskopie

Die Analysen der nicht ausschließlich fluoreszent visualisierten Genexpressionsmuster sowie der Daten von *Triops cancriformis* wurden mit einem Axiophot (Zeiss) vorgenommen, analog photographiert wurde mit der integrierten Mikroskopkamera (Filmkassette 35 mm Mot), digital mit einer Nikon D1unter Zuhilfenahme der Software Nikon-Capture.

II.4.3 Konfokale Mikroskopie

Die fluoreszenten Markierungen bei *Limulus polyphemus* und *Lepisma saccharina* wurden mit verschiedenen konfokalen Mikroskopen untersucht. Verwendet wurden ein Zeiss Laser Scanning Microscope (LSM) Pascal 5, ein Zeiss LSM 510 Meta sowie ein Leica LSM.

II.4.4 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Vorbereitung der Rasterelektronenmikroskopie wurden die Embryonen und Larven in Bouin (Romeis, 1989) für mindestens 12 h fixiert, anschließend mehrmals in EtOH (70 %) gewaschen und über eine Alkoholreihe dehydriert. Die anschließende Trocknung erfolgte in CO₂ mit dem Critical Point Dryer BAL-TEC 030, die Goldbeschichtung mit dem Sputter Coater BAL-TEC 005. Die Bilder wurden mit einem Leica Scanning Electron Microscope produziert.

II.5 STANDARDS UND VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Mit Ausnahme der Photos der lebenden Tiere und in den Fällen, in denen eine gesonderte Erwähnung vorliegt, sind alle Abbildungen so orientiert, daß der anteriore Bereich der Tiere zur Blattoberkante zeigt und der posteriore zur Blattunterkante.

Ich bezeichne die 2. prosomale Extremität von *Limulus polyphemus* als „Pedipalpus“ und nicht als Laufbein (auch wenn diese Extremität sich bei den weiblichen Tieren nicht von einem solchen unterscheidet), da bei den ausgewachsenen Männchen diese Extremität zu einem „Clasper“ spezifiziert wurde. Die Pedipalpen werden bei der Häutung zum adulten Tier zu kräftigen Zangen umgebildet, mit denen sie sich während der Paarungssaison an

das Opisthosoma eines Weibchen heften und dieses während der Zeitspanne von April/Mai bis Juli (und manchmal auch während der Winterruhe) nicht mehr loslassen.

Verwendete Abkürzungen:

Dll = *Distal-less*

PH-3 = Phospho-Histon-3

ap = anterior-posterior

pd = proximo-distal

SNS = Stomatogastrisches Nervensystem

ZNS = Zentrales Nervensystem

PNS = Peripheres Nervensystem

IVN = Inferiorer Ventrikulärnerv

LSM = Laser Scanning Microscope

III. ERGEBNISSE

III.1 DIE EMBRYONALSTADIEN VON *LIMULUS POLYPHEMUS* (STAGING)

Über die Embryologie von *Limulus polyphemus* liegen zwei Arbeiten vor, die den Versuch einer Einteilung in festgelegte Stadien (staging) unternehmen (Brown & Clapper, 1981; Sekiguchi *et al.*, 1982). Für meine Untersuchungen habe ich mich an dieser Stadieneinteilungen orientiert, mußte aber Stellen/Stadien ändern, die nicht mit meinen Beobachtungen übereinstimmten. Darüber hinaus konnte ich eine gewisse zeitliche Varianz bei der Ausbildung insbesondere der opisthosomalen Extremitäten feststellen, die jedoch nicht genauer untersucht wurde. Im Folgenden werden die Embryonalstadien beschrieben und bildlich dargestellt, beginnend mit dem ersten deutlich segmentierten Stadium. Hinsichtlich der früheren Stadien stimmen meine Beobachtungen mit den Untersuchungen der genannten Autoren überein; diese Beschreibungen werden deshalb hier nicht weiter dokumentiert. Die Stadienbeschreibungen werden nicht mit genauen Zeitangaben wie beispielsweise „Tage nach der Befruchtung“ korreliert, da die Entwicklungsgeschwindigkeit von Arthropoden stark temperaturabhängig ist (siehe unter anderem Sweetman, 1938; Sarhage, 1954). So benötigt *Limulus polyphemus* bei einer Temperatur von ungefähr 15 °C mindestens 1,5mal so lange wie die von Brown & Clapper (1981) bei $\pm 22-23$ °C beobachteten Tiere, wohingegen die Pfeilschwanzkrebseier von Sekiguchi *et al.* (1982) bei Kulturtemperaturen von ± 30 °C nur die Hälfte der Zeit bis zum Schlupf der Larve benötigten. Für *Lepisma saccharina* liegt eine Beschreibung und bildliche Darstellung der Embryonalstadien vor (Mittmann, 2000); Zeichnungen dieser Stadien werden gegebenenfalls zum besseren Verständnis der Genexpressionsmuster eingefügt. Die Keimstreifen werden ausgestreckt mit Sicht auf die Ventralseite dargestellt, unabhängig von ihrer Lage im Ei. Die Beschreibungen beziehen sich insbesondere auf morphologische Veränderungen der Ventralseite. Bei *Limulus polyphemus* werden in Klammern zusätzlich die Stadiennummern und die Zeitangaben hinsichtlich der Tage nach der Befruchtung von Brown & Clapper (1981) vermerkt.

S00-Stadium (13; 9d)

Die ovale Keimscheibe ist durch Furchen in 5 Segmente unterteilt. Auffälligstes Merkmal ist eine transversale Rinne, die den Keimstreif in zwei Längshälften gliedert. Am anterioren Ende der Rinne invaginiert im weiteren Verlauf der Entwicklung das Stomodaeum, am posterioren Ende bildet sich das Proctodaeum.

S0-Stadium (14; 11d; Abb. 3)

Der Embryo hat sich verlängert, insbesondere das anteriore Ende ist schmaler und rechteckiger geworden. Die transversale Rinne ist deutlich sichtbar, an ihrem anterioren Ende beginnt das Stomodaeum mit der Einstülpung. Die sechs Paare prosomaler Anhänge haben sich als längliche, ovale Knospen entwickelt. Die Entwicklungsrichtung erfolgt von

anterior nach posterior. Das sich einstülpende Stomodaeum befindet sich anterior der Chelicerenknospen (= 1. Anhangspaar).

S1-Stadium (15; 12 d; Abb4)

Der Rand des Embryos hebt sich deutlich vom Dotter ab; das anteriore Ende bleibt rechteckig. Die transversale Rinne ist nach wie vor deutlich erkennbar. Das sich einstülpende Stomodaeum liegt noch anterior der Chelicerenknospen.

Die prosomalen Anhänge vergrößern sich; die ersten fünf Paare bekommen eine rundere Form, wohingegen die Knospen des sechsten Extremitätenpaares noch oval bleiben. Beidseitig lateral des vierten und fünften Extremitätenpaares beginnt sich das sogenannte Lateralorgan zu entwickeln, dessen Funktion nach wie vor ungeklärt ist. Eventuell besteht eine funktionelle Verbindung zu den embryonalen Häutungen, denn die Exuvien sind nach der Häutung mindestens eine Weile lang an den Lateralorganen befestigt. Von den opisthosomalen Anhängen ist ein Paar schräg nach posterolateral verlaufende Knospen zu erkennen.

Aus den ersten deutlich sichtbaren Opisthosomalanhängen wird im weiteren Entwicklungsverlauf via Verschmelzung das Genitaloperculum, das posterior der sich später entwickelnden Chilaria als 2. Opisthosomalanhäng angesehen wird.

S2-Stadium (16; 13d; Abb. 5)

Die prosomalen Extremitätenknospen verlängern sich und bekommen eine längliche Form. Das Stomodaeum liegt anterior der Chelicerenknospen. Die runden Lateralorgane sind deutlicher als im S1-Stadium lateral der vierten und fünften Extremitäten zu sehen. Nach wie vor tritt die transversale Rinne deutlich hervor.

Am Opisthosoma sind zwei Paar längliche Anhangsknospen zu sehen.

S3-Stadium (17; 14d; Abb.6)

Die prosomalen Extremitäten haben sich weiter verlängert. Sie laufen am distalen Ende länglich-spitz aus. Die Stomodaeumöffnung ist leicht nach posterior gewandert und liegt zwischen den Chelicerenknospen. Lateral des vierten Laufbeinpaares beginnen sich die kleinen runden Knospen des zukünftigen Flabellums zu entwickeln. Zwischen dem vierten Laufbeinpaar und dem Segment des Genitaloperculums findet man einen schmalen, leicht verdickten Streifen. In diesem Segment entstehen später die Chilaria, die den Mundraum posterior begrenzen, aber im allgemeinen als Anhänge des Opisthosomas gewertet werden. Am Opisthosoma findet man neben den Verdickungen im Segment der Chilaria und dem Genitaloperculum noch ein bis zwei Paar längliche Knospen vor. Aus diesen entstehen später Extremitäten in Form von Blattbeinen, an denen sich die Buchkiemen entwickeln.

Nach diesem Stadium findet die erste embryonale Häutung statt. Anschließend ist der Embryo von einer milchigen weißlichen Flüssigkeit umgeben. Es können erste

Bewegungen der prosomalen Extremitäten beobachtet werden, die im Verlauf der weiteren Entwicklung zunehmen.

S4-Stadium (18; 15d; Abb. 7)

Die prosomalen Extremitäten haben sich weiter verlängert, die erste Gliederung wird deutlich sichtbar. Die stomodaeale Einstülpung sitzt zwischen den Cheliceren. Die distalen Enden der Extremitäten spitzen sich weiter zu. Das Lateralorgan sitzt lateral des vierten Prosomaanhangs und beginnt oval zu werden. Anterior des Lateralorgans entwickelt sich die erste Anlage des Lateralauges. Das Flabellum liegt als kleine runde Knospe seitlich des sechsten prosomalen Anhangs.

Am Opisthosoma sind die Knospen des Genitaloperculums und der ersten Buchkieme deutlich ausgebildet, von zwei weiteren Segmenten sind wulstige Erhebungen zu sehen. Im Chilariasegment findet man eine längliche Verdickung oder Knospe.

Die Hepatopankreas beginnt sich äußerlich sichtbar zu segmentieren.

Nach diesem Stadium findet die zweite embryonale Häutung statt.

S5-Stadium (19; 17d; Abb. 8)

Die Extremitäten haben sich weiter verlängert. An ihren distalen Enden beginnt die Ausbildung der Scheren/Klauen durch die Entwicklung kleiner Fortsätze. Das Flabellum hat an Größe zugenommen. Das Stomodaeum sitzt nach wie vor zwischen den Cheliceren, bewegt sich aber während dieses Stadiums relativ rasch nach posterior und sitzt dann hinter den Cheliceren.

Die opisthosomalen Extremitätenanlagen verdicken sich weiter und wandern medial aufeinander zu. Die Chilaria sind als runde Knospen ausgebildet. Eine Segmentierung des Opisthosomas in sechs Segmente (incl. Chilariasegment) wird sichtbar. Zwischen Pro- und Opisthosoma bildet sich eine leichte Einschnürung. Im weiteren Verlauf verschmälert sich das Opisthosoma, während das Prosoma rund bleibt. Am Rand beidseitig des Opisthosomas bildet sich eine wulstige Verdickung, die durch sechs kleine Knospen die Entstehung der Lateraldornen ankündigt. Ein unpaare Verdickung am posterioren Ende ist der Ursprungsort des späteren Schwanzstachels.

Die Segmentierung des grünen Hepatopankreas wird äußerlich gut sichtbar und beginnt mit der Ausdehnung auf die Dorsalseite. In diesem Stadium beginnt eine Gewebe-Überwachsung des mediolateralen Bereichs des dorsalen Anteils des Keimstreifs. Die Funktion dieser Überwachsung ist unbekannt. Ungefähr in diesem Entwicklungsstadium findet die dritte Embryonalhäutung statt.

S6-Stadium (19-20; 21d; Abb. 9)

Die prosomalen Extremitäten haben sich weiter verlängert und ihre endgültige Gliederung angenommen. Die Scheren an den distalen Enden sind deutlich sichtbar. Am letzten Laufbeinpaar wurden am distalen Bereich der Tibia vier kleine, in einem Halbkreis angeordnete Fortsätze ausgebildet. Aus ihnen entsteht im weiteren Verlauf die

skistockähnliche Struktur, mit deren Hilfe die Pfeilschwanzkrebse wie mit einem Schneeschuh auf dem Sand laufen respektive sich abstoßen können, ohne dabei einzusinken. Aus diesem Grunde wurden sie von Barthel (1974) als „pusher“ bezeichnet (Tafel 1, Abb. 3). Das Stomodaeum ist weiter posterior gewandert und liegt nun ungefähr zwischen den Basen der Pedipalpen. Das Flabellum ist länglich ausgewachsen.

Die Chilaria sitzen als runde Knospen mediolateral der Basen des letzten Laufbeinpaares. Am zukünftigen Genitaloperculum und dem darauf folgenden Blattbeinpaar mit Buchkiemen sind an der medianen Seite kleine, nach posterior gerichtete Fortsätze gebildet worden. Diese werden oft als der distale Anteil einer ursprünglichen Extremität gedeutet. Die darauf folgenden Opisthosomaanhänge liegen als ovale, dicke Knospen vor. Die Lateraldornen am Opisthosoma sind zu Knospen ausgebildet; eine kleine, nach posterior weisende Knospe markiert den Bereich, in dem nach der ersten postembryonalen Häutung der Schwanzstachel entsteht.

Die Segmentierung des Hepatopankreas ist so weit fortgeschritten, daß sie auf der gesamten Dorsalseite sichtbar ist. Das sich entwickelnde Lateralauge ist in posterodorsale Richtung gewandert, so daß es nahe der anterodorsalen Seite des Lateralorgans liegt. Das Lateralauge hat sich in einen größeren braunen und einen kleineren weißen Bereich untergliedert. Am anteromedianen Prosomarang entwickelt sich auf der Dorsalseite das Paar runder Medianaugen.

S7-Stadium (20; 22d; Abb. 10)

Das Opisthosoma nimmt eine eher dreieckige Gestalt an, während das Prosoma rund bleibt, seitlich etwas ausladender wird und sich dorsal abflacht. Die prosomalen Extremitäten haben sich weiter verlängert, an einigen Gliedern beginnen kleine Dornen auszuknospen. Die vier „Skistock“-Fortsätze an der Tibia des letzten Laufbeines haben sich vergrößert; sie sind nach wie vor im Halbkreis angeordnet. Das Flabellum hat sich verlängert und ist am distalen Ende abgerundet.

Am Opisthosoma sitzen die runden Chilariaknospen nach wie vor mediolateral der Basen des letzten Laufbeinpaares. Die beiden ovalen Anhänge des Genitaloperculums haben sich erheblich vergrößert. Sie stoßen in der Medianen beinahe mit den kleinen Fortsätzen zusammen. Die Verschmelzung der beiden Knospen hat jedoch noch nicht begonnen, setzt aber relativ rasch ein; die mediobasalen Anteile des Anhangspaares verwachsen, während die medialen Fortsätze zurückgebildet werden. Die Anhänge des zukünftigen Genitaloperculums bedecken bereits in diesem Stadium einige der darauffolgenden Knospen der Blattbeine. Die Knospen der Lateraldornen am Opisthosoma sind stärker ausgeprägt. Das Lateralauge hat sich vergrößert und ist weiter nach posterior gewandert, so daß es posterodorsal des verbliebenen Lateralorgans sitzt. Die Unterteilung in einen braunen und einen weißen Anteil des Lateralauges bleibt bestehen. Die runden Medianaugen auf der anteromedianen Seite des Prosomas vergrößern sich. Anteromedial der Chelicerenknospen sieht man erst zwei, später drei eng beieinander liegende Bereiche, an denen sich eine weiße Struktur abzeichnet, ähnlich dem weißen Anteil des Lateralauges; sie sind die ersten Anzeichen für die Entwicklung der Ventralaugen. Das Hepatopankreas zeigt von dorsal erste Anzeichen für die innere Umstrukturierung in ein verästeltes

Gebilde, das die Dorsalansicht des bald entstehenden Trilobitenstadiums dominiert. Nach dem S7-Stadium findet die vierte Embryonalhäutung statt.

S8-Stadium (Trilobitenstadium; 21; 26-27d; Abb. 11)

Pro- und Opisthosoma sind halbkreisförmig, das Opisthosoma ist etwas kleiner als das Prosoma. Mit Ausnahme eines kleinen medianen Bereiches sitzen in regelmäßigen Abständen Borsten entlang des gesamten Prosomarandes. Auf der antero-ventralen Seite des Prosomas findet sich eine oval-längliche Ausbuchtung. Die prosomalen Extremitäten haben ihre endgültige Gliederung erfahren und laufen am distalen Ende in zweigliedrige Scheren aus. Mit Ausnahme der Cheliceren befinden sich am medianen Rand der Coxen aller prosomaler Anhänge bewegliche Dornen; an der Coxa des letzten Laufbeinpaars ist die Anzahl der Dornen geringer als an den übrigen Extremitäten. Auch die Chilaria, die die spätere Mundöffnung, die zwischen den Extremitäten liegt, posterior abschließt, ist mit einigen beweglichen Dornen besetzt. Am Trochanter der prosomalen Extremitäten mit Ausnahme der Cheliceren finden sich Fortsätze, aus denen später vier bewegliche Dornen entstehen, einer in der Mitte des Trochanters, einer im distalen Drittel und zwei benachbarte distal neben der Gelenkverbindung mit dem Femur (Abb.11, Abb. 12). Die vier „Skistock“-Dornen an der Tibia des letzten Laufbeinpaars haben weiter an Größe zugenommen. Alle Extremitäten sind mit einzelnen Borsten besetzt. Das Flabellum hat weiter an Größe zugenommen. Anterior der Cheliceren sind die drei Ventralaugenanlagen deutlich zu sehen.

Am Opisthosoma ist das zweite Anhangspaar zum prominenten Genitaloperculum verschmolzen. Die kleinen medianen Fortsätze sind erheblich verkleinert und weisen auf die posteriore Seite; somit sind sie in der Ventralansicht nicht sichtbar. Der Rand des Genitaloperculums ist mit zahlreichen langen Borsten besetzt. Unter dem Genitaloperculum befinden sich die ersten zwei Blattbeinpaare, die ihrerseits aus verschmolzenen Anhangsparen entstanden sind. Die Anzahl der respiratorisch aktiven Lamellen (Buchkiemen, Abb. 13), die an den Blattbeinen gebildet werden, wird im Verlauf der weiteren Entwicklung erheblich vermehrt. Am Rand des halbkreisförmigen Opisthosomas sitzen an jeder Seite die sechs beweglichen Lateralornen, die im weiteren Entwicklungsverlauf an Größe zunehmen und Träger zahlreicher Sinnesorgane sind. Die Anlage des zukünftigen Schwanzstachels sitzt noch als unbeweglicher, dreieckiger Fortsatz am hinteren Opisthosomarand. Erst nach der nächsten Häutung bekommt er seine gelenkige Verbindung und nimmt an Länge zu.

Die Lateralaugen liegen nach wie vor posterodorsal der Lateralorgane; ihr anteriorer Bereich ist braun, der posteriore weiß. Die beiden Medianaugen sitzen seitlich auf einer kleinen prosomalen Erhebung, die sich im Verlauf der Juvenilentwicklung zu einem spitzen Fortsatz entwickelt. Dieser wird mit zunehmendem Alter wieder flacher und runder. Das Hepatopankreas scheint dorsal durch den weitgehend transparenten sogenannten Carapax hindurch und bildet ein verzweigtes Geflecht, das den größten Teil des Prosomas ausfüllt.

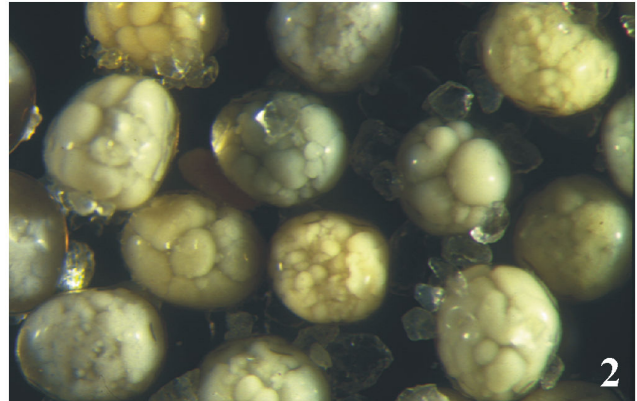
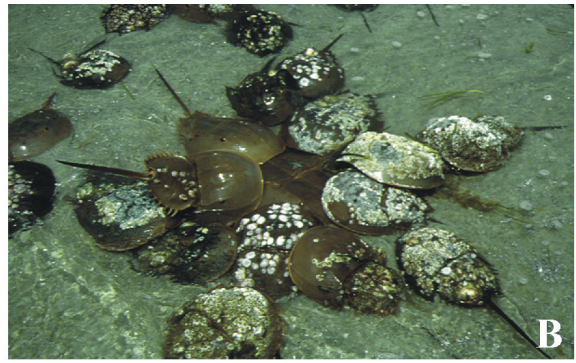
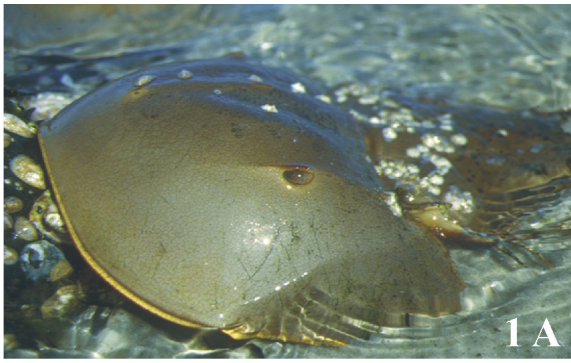


Abb. 1 *Limulus polyphemus* in natürlicher Umgebung. A. Männchen in Paarungsstellung an ein Weibchen gehängt. B. Zahlreiche Satellitenmännchen um ein großes Weibchen versammelt. C. Frisch geschlüpfte Trilobiten-Stadien finden sich immer wieder im Spülsaum.

Abb. 2 *Limulus polyphemus* Gelege. Die Eier zeigen eine große Farbvarianz. Die ersten Dotterfurchungen scheinen völlig ungeordnet zu verlaufen. Später sind alle Kompartimente gleich groß.

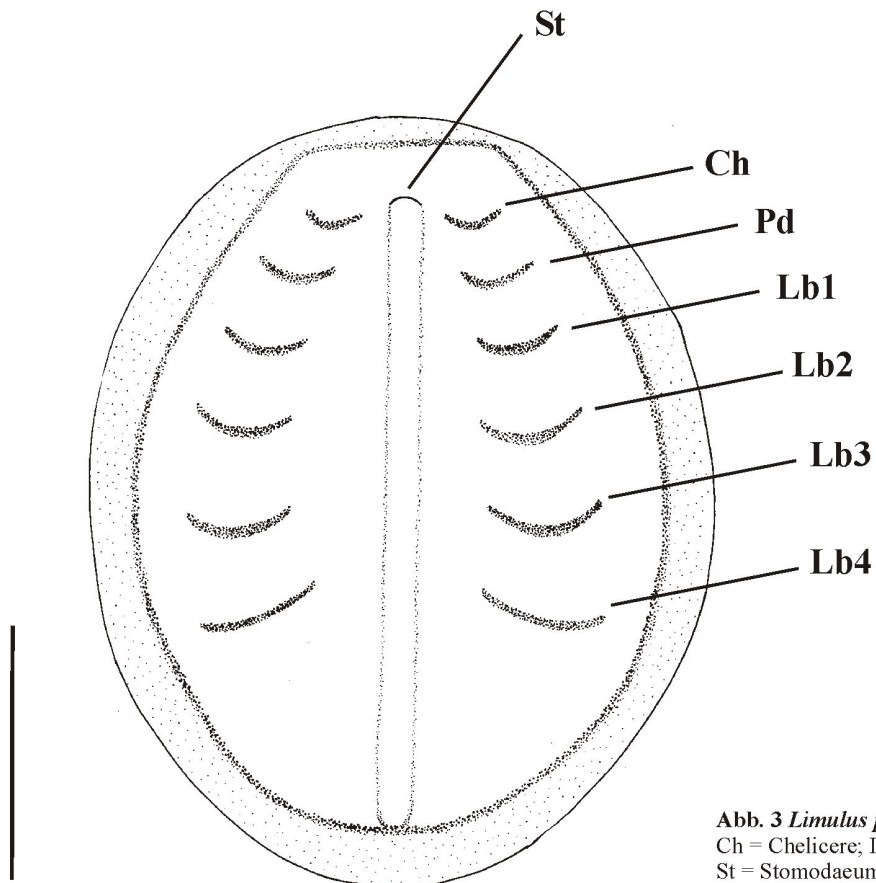


Abb. 3 *Limulus polyphemus* S0-Stadium.
Ch = Chelicere; Lb = Laufbein; Pd = Pedipalpe;
St = Stomodaeum; Scale = 0,5 mm.

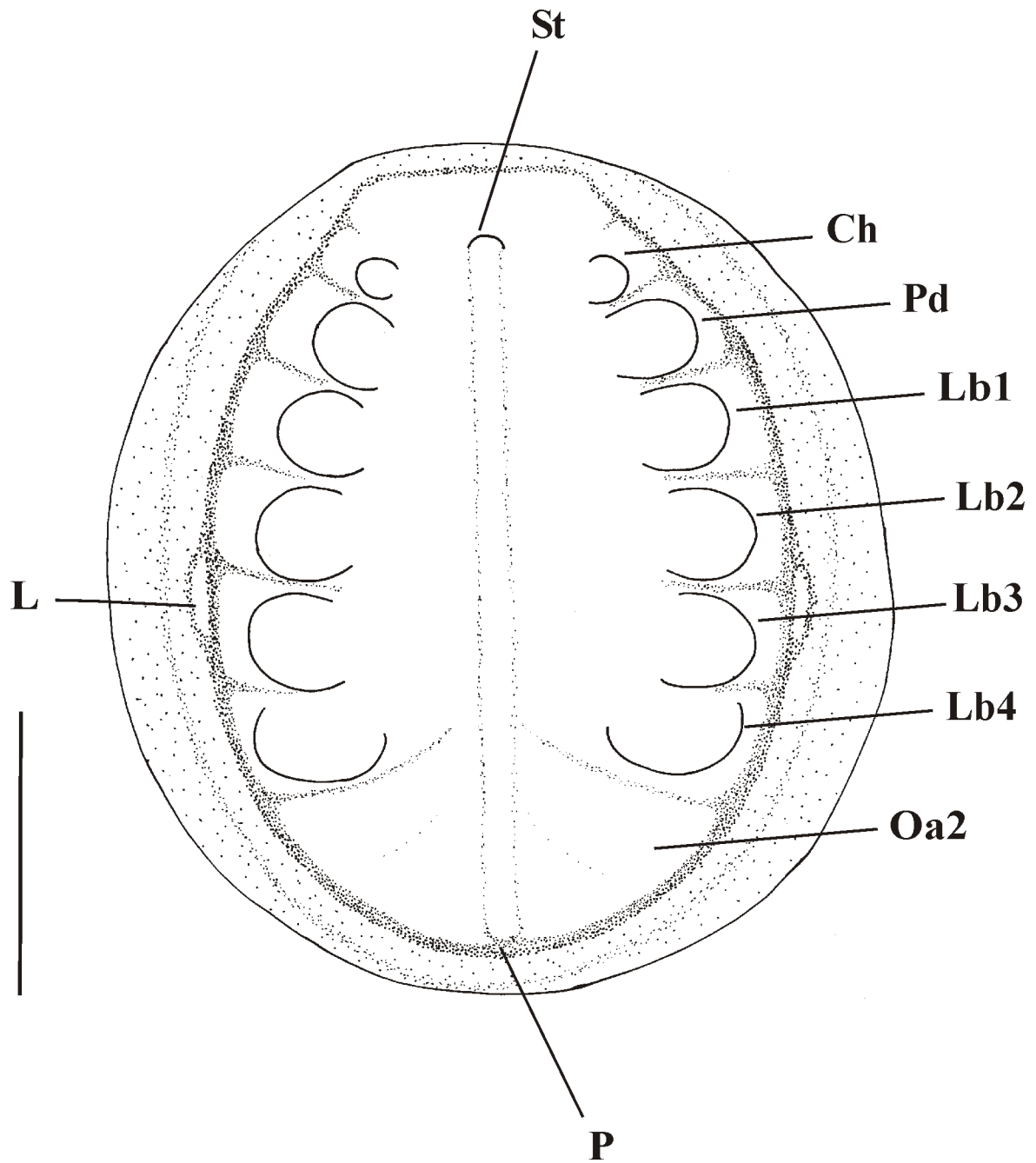


Abb. 4 *Limulus polyphemus* S1-Stadium.

Ch = Chelicere; L = Lateralorgan; Lb = Laufbein; Oa = Opisthosomalanhang; P = Proctodaeum; Pd = Pedipalpe;
St = Stomodaeum; Scale = 0,5 mm.

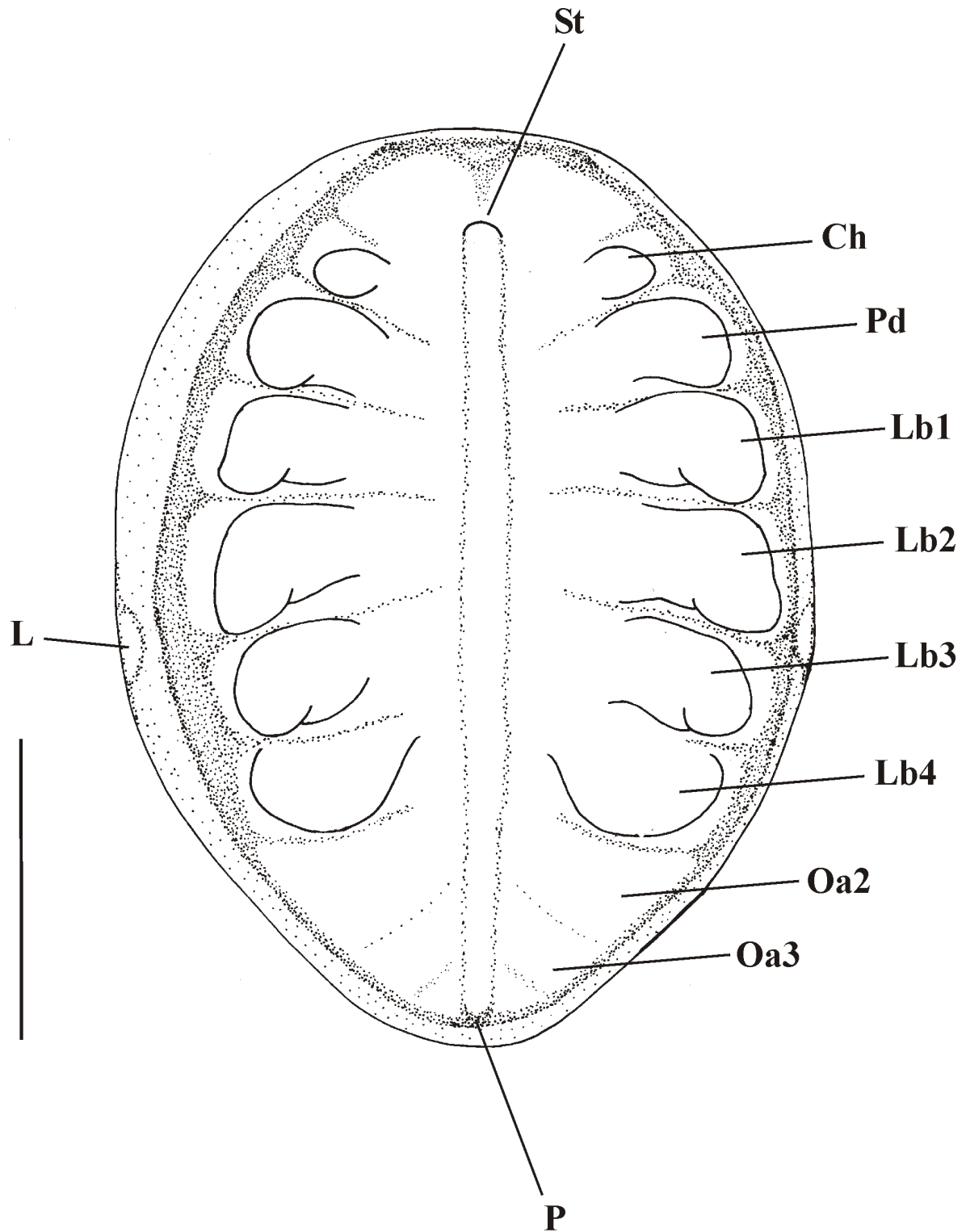


Abb. 5 *Limulus polyphemus* S2-Stadium.

Ch = Chelicere; L = Lateralorgan; Lb = Laufbein; Oa = Opisthosomalanhänge; P = Proctodaeum; Pd = Pedipalpe;
St = Stomodaeum; Scale = 0,5 mm.

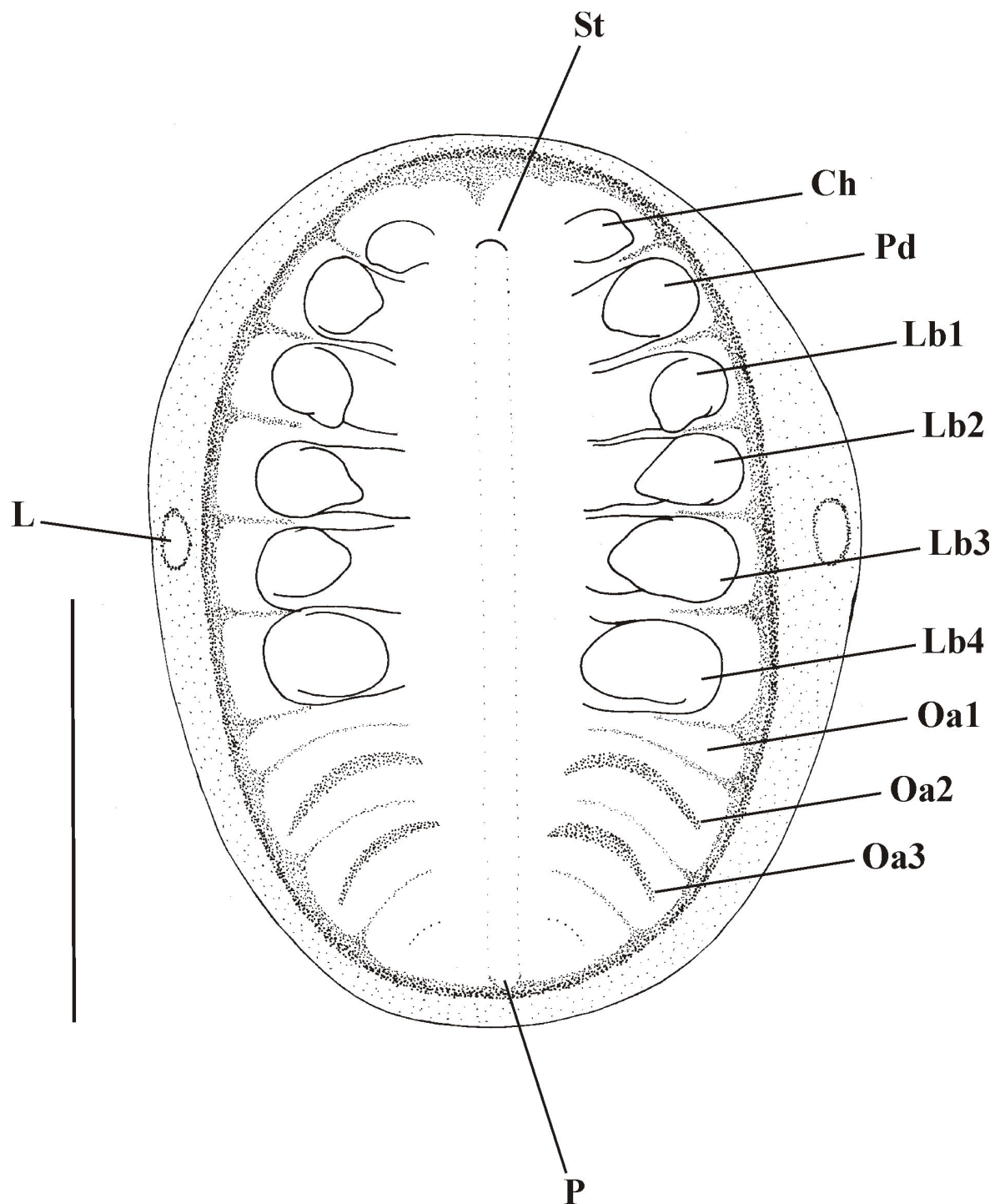


Abb. 6 *Limulus polyphemus* S3-Stadium.

Ch = Chelicere; L = Lateralorgan; Lb = Laufbein; Oa = Opisthosomalanhäng (Oa1 = Chilaria; Oa2 = Genitaloperculum; Oa3 = erstes Buchkiemen tragendes Blattbein; P = Proctodaeum; Pd = Pedipalpe; St = Stomodaeum; Scale = 1 mm.

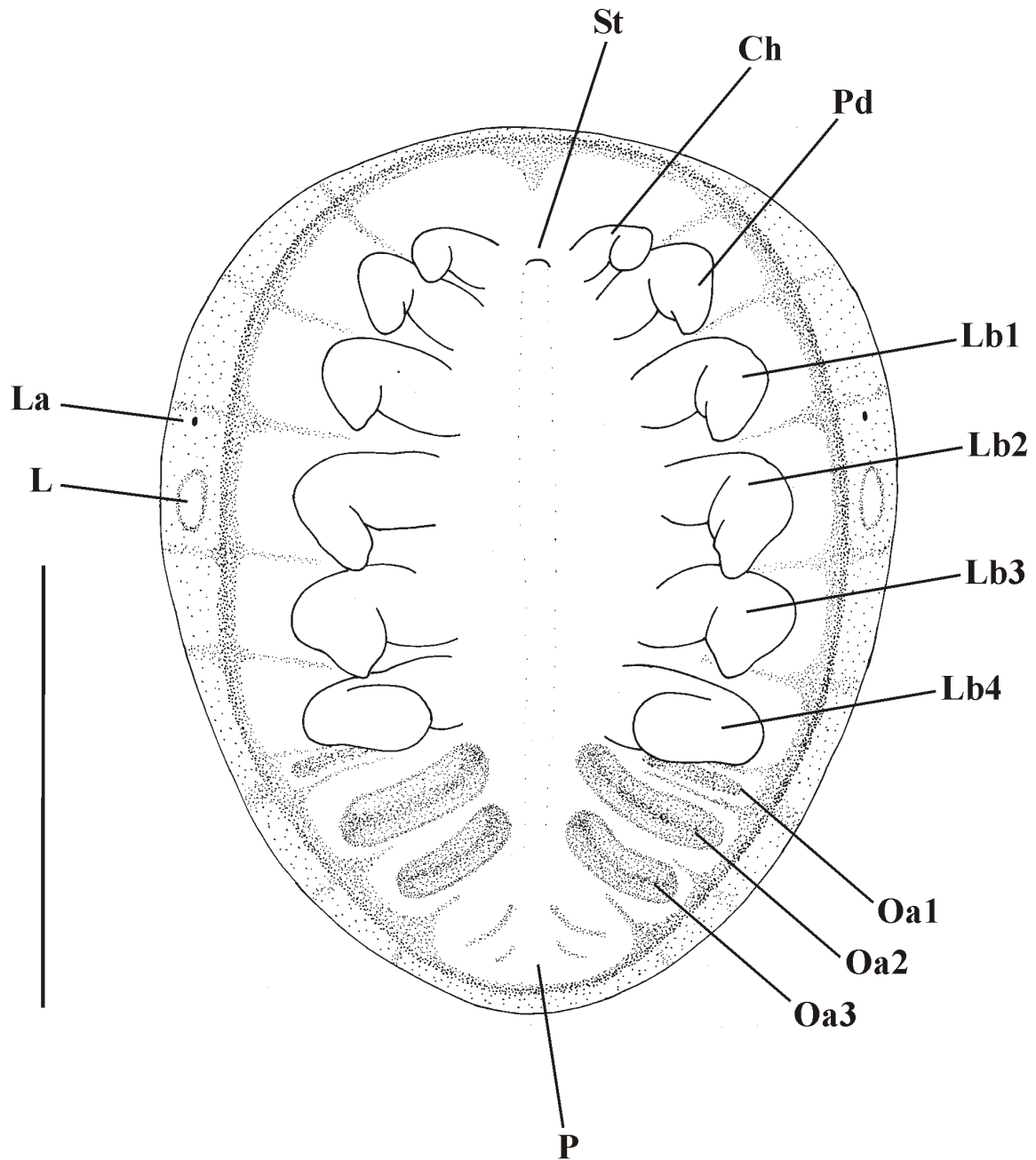


Abb. 7 *Limulus polyphemus* S4-Stadium.

Ch = Chelicere; L = Lateralorgan; La = Lateralauge; Lb = Laufbein; Oa = Opisthosomalanhang (Oa1 = Chilaria; Oa2 = Genitaloperculum; Oa3 = erstes Buchkiemen tragendes Blattbein; P = Proctodaeum; Pd = Pedipalpe; St = Stomodaeum; Scale = 1 mm.

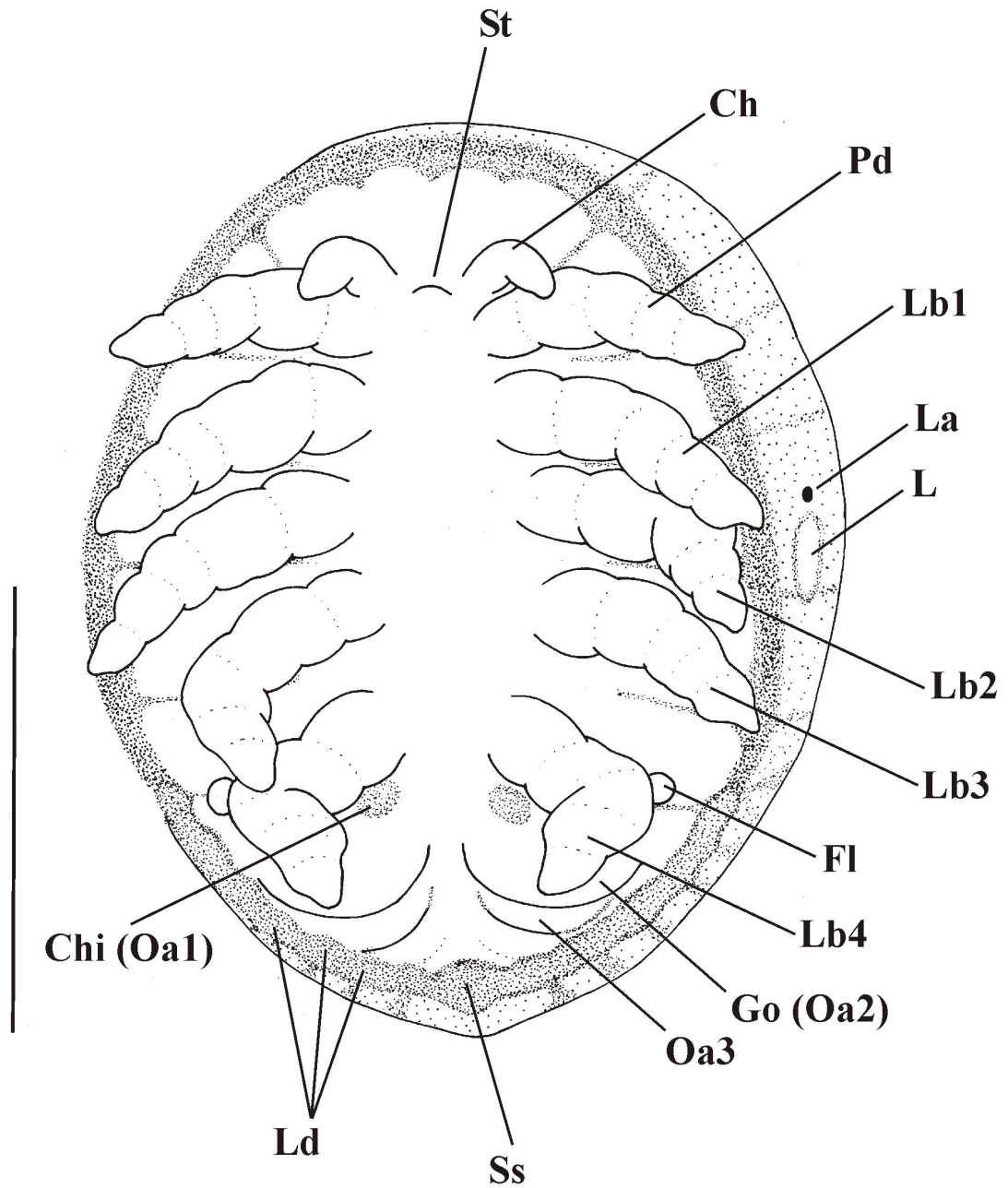


Abb. 8 *Limulus polyphemus* S5-Stadium.

Ch = Chelicere; Chi = Chilaria; F = Flabellum; Go = Genitaloperculum (Oa2); L = Lateralorgan; La = Lateralauge;
Lb = Laufbein; Ld = Lateraldornen; Oa = Opisthosomalanhang (Oa3 = erstes Buchkiemen tragendes Blattbein;
P = Proctodaeum; Pd = Pedipalpe; Ss = Schwanzstachel; St = Stomodaeum; Scale = 1 mm.

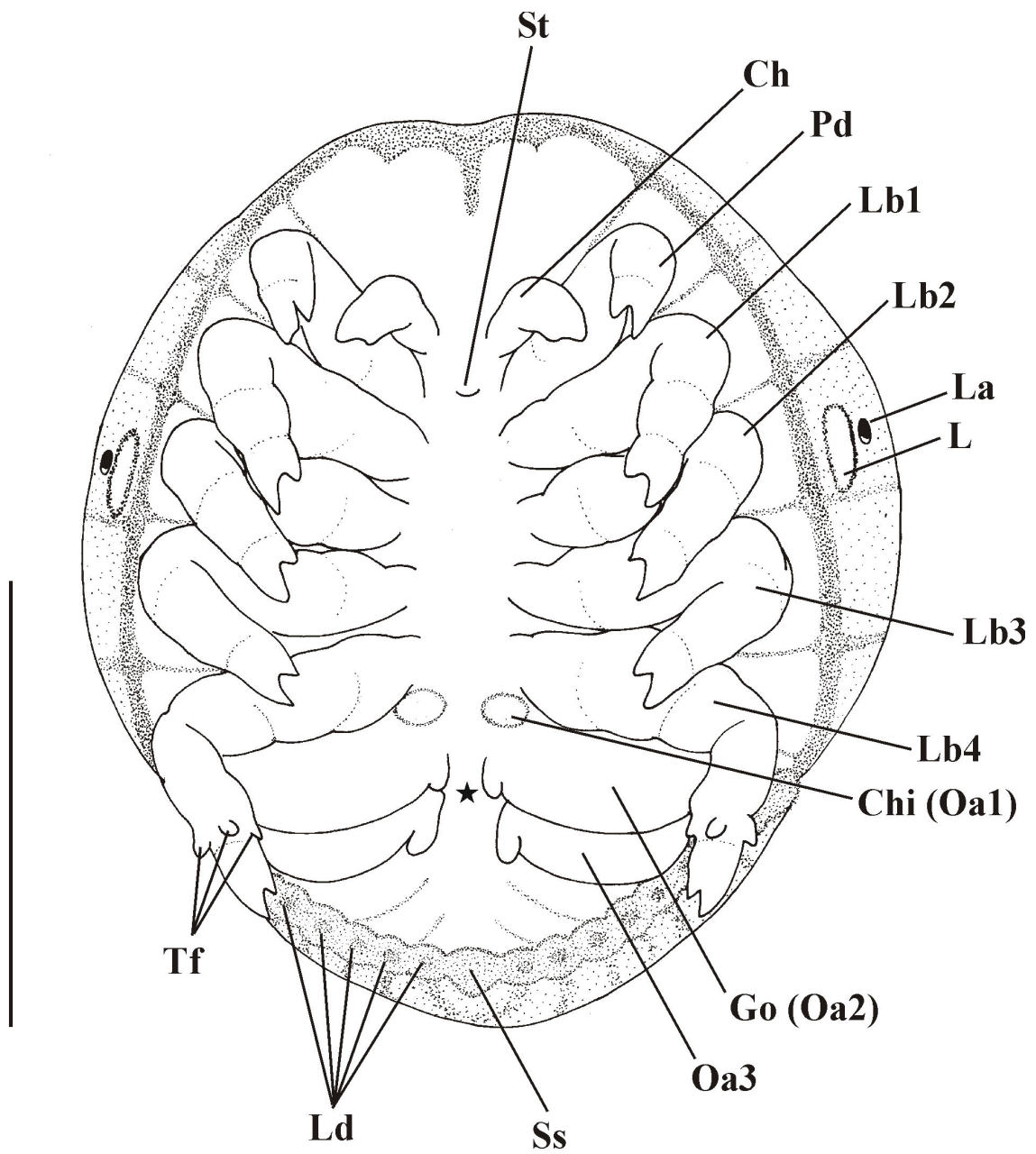


Abb. 9 *Limulus polyphemus* S6-Stadium

Ch = Chelicere; Chi = Chilaria; F = Flabellum; Go = Genitaloperculum (Oa2); L = Lateralorgan; La = Lateralauge; Lb = Laufbein; Ld = Lateraldornen; Oa = Opisthosomalanhang (Oa3 = erstes Buchkiemen tragendes Blattbein); P = Proctodaeum; Pd = Pedipalpe; Ss = Schwanzstachel; St = Stomodaeum; Tf = Tibialfortsatz; ★ = Medianfortsatz des Genitaloperculums; Scale = 1 mm

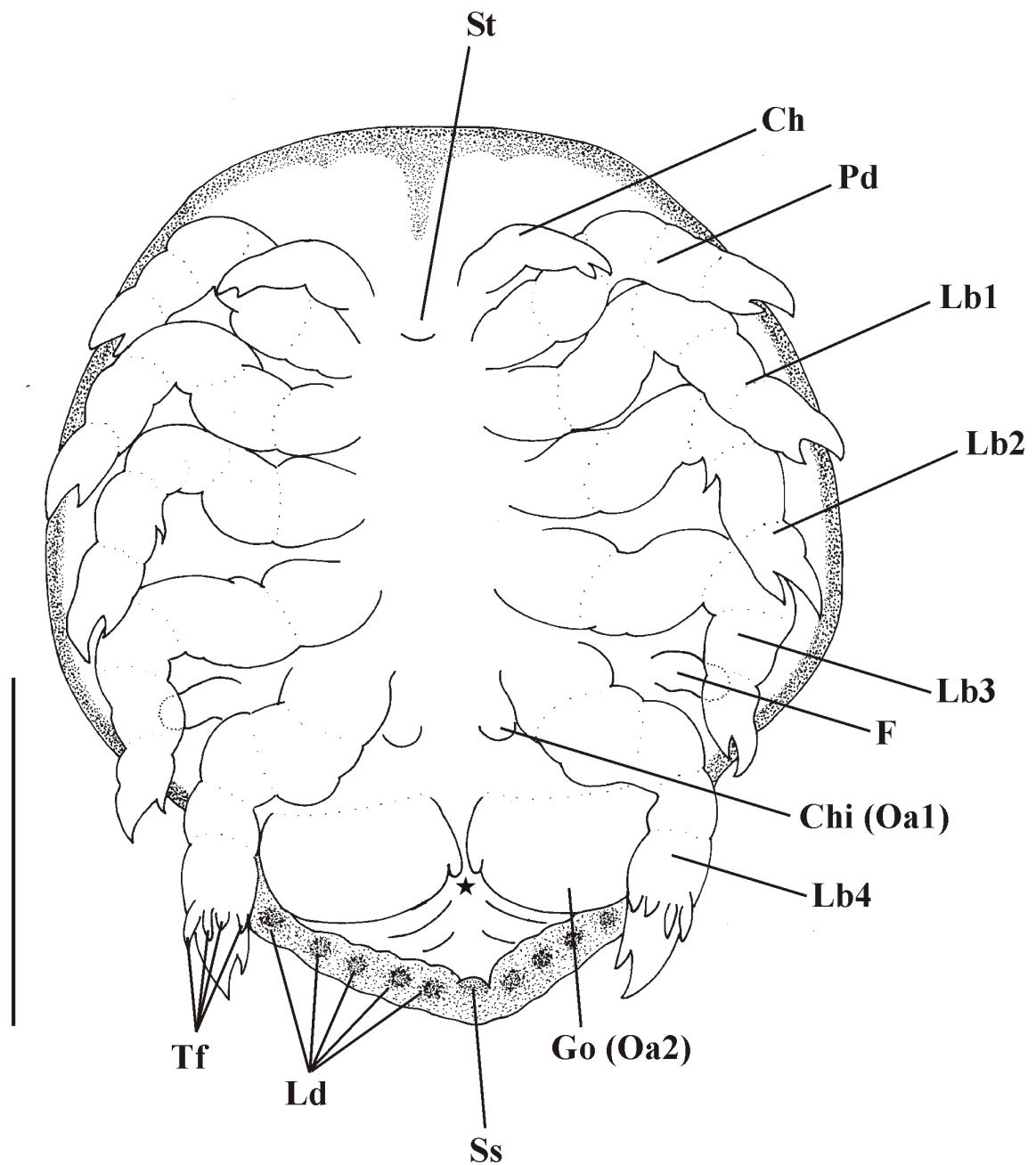


Abb. 10 *Limulus polyphemus* S7-Stadium.

Ch = Chelicere; Chi = Chilaria; F = Flabellum; Go = Genitaloperculum (Oa2); L = Lateralorgan; La = Lateralauge; Lb = Laufbein; Ld = Lateraldornen; Oa = Opisthosomalanhang; P = Proctodaeum; Pd = Pedipalpe; Ss = Schwanzstachel; St = Stomodaemum; Tf = Tibialfortsatz; ★ = Medianfortsatz des Genitaloperculums; Scale = 1,25 mm.

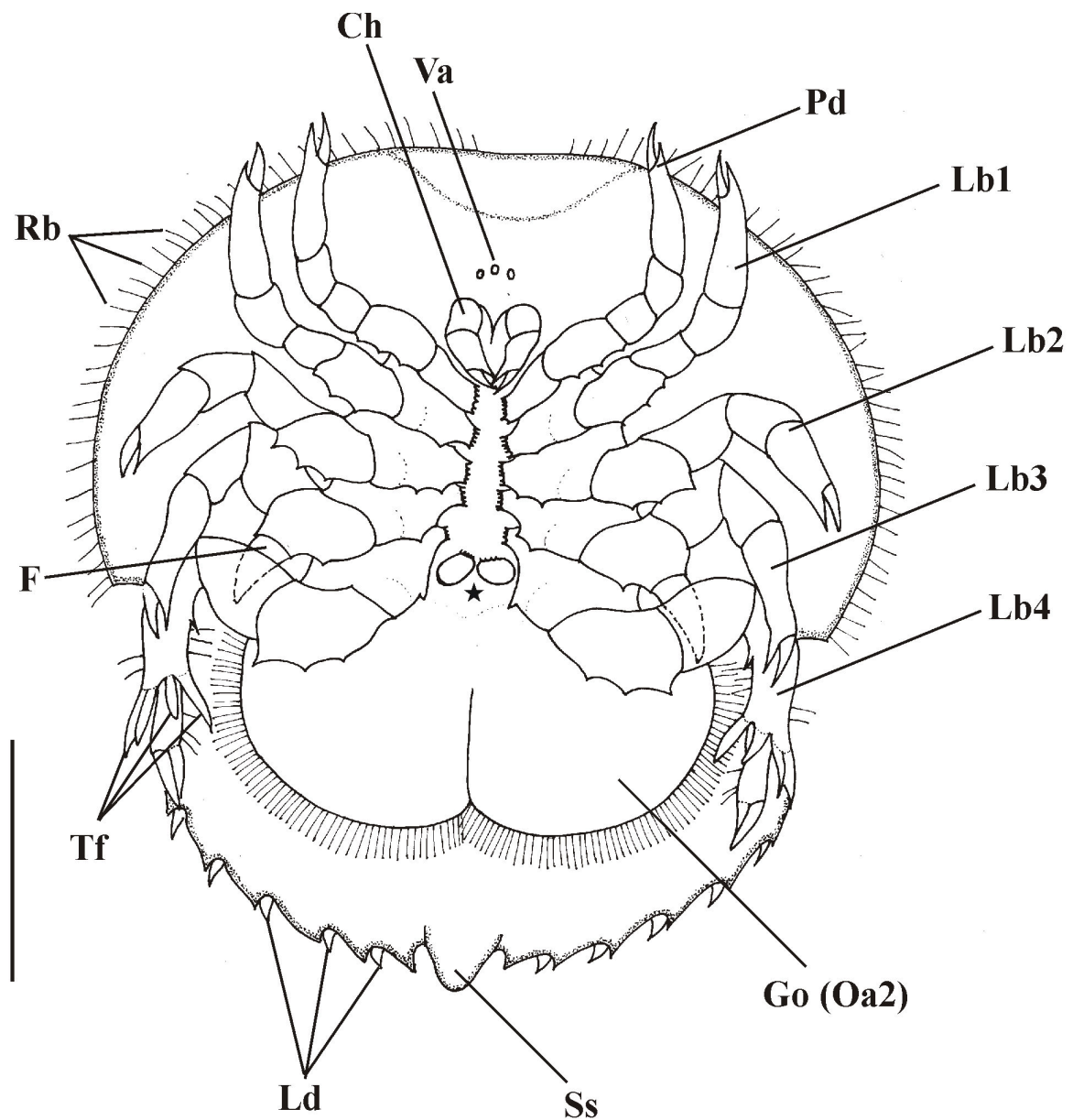


Abb. 11 *Limulus polyphemus* S8-Stadium (Trilobitenstadium). Ch = Chelicere; F = Flabellum; Go = Genitaloperculum (Oa2); L = Lateralorgan; La = Lateralauge; Lb = Laufbein; Ld = Lateraldornen; Oa = Opisthosomalanhalt; Pd = Pedipalpe; Rb = Randborste; Ss = Schwanzstachel; Tf = Tibialfortsatz; Va = Ventralaugen; ★ = Chilaria; Scale = 1 mm.

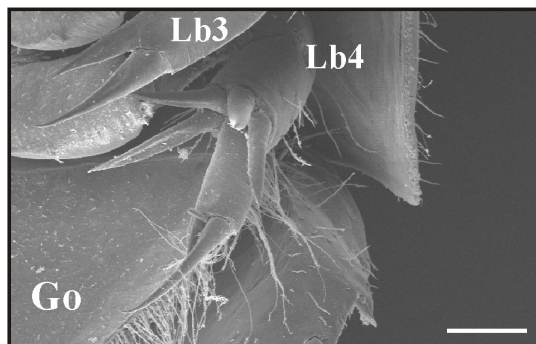


Abb. 12 *Limulus polyphemus*, Tibialfortsätze S8-Stadium. Die Skistockförmigen Tibialfortsätze (Tf) am 4. Laufbeinpaar (Lb4). Go = Genitaloperculum; Scale = 0,2 mm.



Abb. 13 *Limulus polyphemus*, Buchkieme S8-Stadium. Am 2. Blattbeinpaar (=Oa3) sitzen die Lamellen der Buchkieme (Bk). Ihre Anzahl wird in der weiteren Entwicklung vermehrt. Scale = 0,2 mm.

III.2 DIE FRÜHE NEUROGENESE

Der Verlauf der Neurogenese von *Limulus polyphemus* wurde mittels verschiedener Marker und neurospezifischer Antikörper untersucht. Als geeigneter Marker für frühe Entwicklungsstadien erwies sich TRITC-konjugiertes Phalloidin. Phalloidin wird aus dem Gift des Grünen Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides* gewonnen. Es lagert sich seitlich an F-Aktinfilamente an und stabilisiert diese irreversibel. Aktinfilamente finden sich in allen Zellwänden, insbesondere jedoch in Muskelfasern, aber auch verstärkt in Nervenzellen. Da F-Aktin ein ubiquitärer Bestandteil des Cytoskeletts ist, kann mittels dieser Färbung zusätzlich die Form der Zellen ermittelt werden. Sobald die Myogenese weiter voranschreitet, empfehlen sich an Stelle von Phalloidin neurospezifische Marker (acetyliertes α -Tubulin, Synapsin (=Synorfl) etc.), um Fluoreszenzüberlagerungen und damit Fehlinterpretationen vorzubeugen. Dies ist insbesondere bei *Limulus polyphemus* von Bedeutung, da die Myogenese früh beginnt und rasch voranschreitet.

Auch wenn meist über die Zellform und das weitere Zellschicksal entschieden werden kann, ob es sich bei den phalloidinmarkierten Zellen um Muskel- oder Nervenzellen handelt, wurden zusätzliche Kontrollen über einen anti-acetyliertes- α -Tubulin-Antikörper sowie einen Anti-Horseradish-Peroxidase-Antikörper (HRP) durchgeführt. Anti-HRP-Antikörper lagern sich an einer membran- und cytoskelettassoziierten β -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase an. Diese finden sich insbesondere in den Membranen von Axonen sowie von präsynaptischen Endknöpfchen. Der Anti-HRP-Antikörper wird deshalb als spezifischer Marker für die Darstellung des Nervensystems von Arthropoden gewertet (Jan & Jan, 1982; Meier & Reichert, 1990; Whittington *et al.*, 1991; Stollewerk *et al.*, 2001).

Um die Teilungsmodi der an der Neurogenese beteiligten Zellen zu ermitteln, wurde ein Mitosemarker verwendet: Anti-Phospho-Histon-H3. Histone sind niedermolekulare, basische Proteine; sie sind an der Bildung des Chromatins beteiligt, einem DNA/Protein-Komplex, der die Chromosomen enthält. In dem Histon/DNA-Komplex sind die Histone von DNA umhüllt; sobald sich jedoch mit Beginn des Mitosezyklus das Chromatin lockert, sind die Histone für Antikörper zugänglich. So erfolgt ein spezifischer Nachweis, eine Art Momentaufnahme, welche Zelle sich gerade in der Teilung befindet. Darüber hinaus wird auf diese Weise die Stellung der Teilungsspindeln sichtbar gemacht, wodurch ermittelt werden kann, in welche Richtung eine Tochterzelle abgegeben wird, ob beispielsweise horizontal oder vertikal.

III.2.1 TRITC-Phalloidin-Markierungen

Die Neurogenese beginnt bei *Limulus polyphemus* ungefähr mit dem mittleren bis späten S0-Stadium. Auf der Ventralseite findet man zwischen den prosomalen Extremitätenknospen und im Kopflappen im Bereich des sich entwickelnden Gehirns zahlreiche phalloidinmarkierte Spots – gebündelte Zellfortsätze, wie sich später zeigen wird. Diese zuerst auftretenden Spots scheinen sich im gesamten Prosoma gleichzeitig zu entwickeln. Im Verlauf der Entwicklung nimmt ihre Anzahl pro Segment zu (Abb.14). Ein ähnlicher Modus wurde auch bei den Araneae-Vertretern *Cupiennius salei* und *Pholcus*

phalangioides beobachtet (Stollewerk *et al.*, 2001). Stollewerk *et al.* (2001, 2003) bezeichnen diese Spots als „Invaginationszentren“; da zumindest bei *Limulus polyphemus* der Entwicklungsmodus dieser Zellcluster wesentlich mehr einer Immigration entspricht, werde ich – sobald die Struktur der Cluster gezeigt wurde – von „Immigrationszentren“ sprechen (siehe Diskussion).

Zwischen den Stadien S0 und S3 finden sich diese Spots nur im prosomalen Abschnitt des Pfeilschwanzkrebs-Embryos, erst danach beginnt die Neurogenese sichtbar auch im opisthosomalen Bereich (Abb. 15). Da der genaue Verlauf der Segmentgrenzen im mediolateralen Bereich mit den verwendeten Methoden nicht genau zu ermitteln war, kann nur eine ungefähre Zahl der Spots angegeben werden. Im S0-Stadium findet man pro Hemisegment ca. 5-7 Spots. In den Stadien S1 bis S3 schwanken die Zahlen zwischen 12-15 phalloidinmarkierter Spots pro Hemisegment. Bis zum S4-Stadium steigt die Anzahl auf 17-24 Spots pro Hemisegment, und im S5-Stadium findet man ca. 30 Spots. Allerdings werden die Spots ab dem S4-Stadium kleiner und unscheinbarer.

In frühen Stadien scheinen die Spots mindestens teilweise in regelmäßigen Längs- und Querreihen angeordnet zu sein (Abb.15, Film 1, 2). Für spätere Stadien und das Opisthosoma kann dies nicht mit Sicherheit bestätigt werden. Niemals findet man direkt nebeneinander liegende Spots, es scheint immer ein Mindestabstand eingehalten zu werden. Darüber hinaus ist eine Symmetrie entlang der transversalen Achse zu erkennen; zumindest etliche Spots eines linken Hemisegments liegen symmetrisch zu denen des entsprechenden rechten Hemisegments.

Was verbirgt sich nun hinter diesen Spots? Fokussiert man mittels konfokalem Mikroskop durch die phalloidinmarkierten Spots hindurch, so findet man, daß sich dorsal eines jeden Spots ein Cluster von Zellen befindet, die etwas größer sind als die sie umgebenden Zellen (Abb. 16, Film 3). Jedes Zellcluster zeigt eine „blümchenähnliche“ Formation und besteht aus mindestens 8-12 Zellen (Abb. 16, Film 3). Ein optischer Querschnitt durch eines dieser Zellcluster zeigt, daß die Zellen eine flaschenförmige Gestalt haben (Abb. 17, 18). Auf der Ventralseite des Neuroektoderms laufen sie in längliche Zellfortsätze aus, die sich auf Höhe der ventralsten Zellschicht zu Bündeln vereinen. Diese gebündelten Zellfortsätze ergeben die stark phalloidinmarkierten Spots auf der Ventralseite (Abb. 14, 15, 16, 17, 18). Ab Stadium S3 kann man beobachten, daß diese Cluster von flaschenförmigen Zellen direkt an der Ausbildung des Nervensystems beteiligt sind. Im dorsalen Bereich jedes Zellclusters wird Neuropil gebildet, das zunächst die zum Cluster gehörenden Zellen teilweise oder vollständig kreisförmig umgibt (Abb. 19). Zu diesem Zeitpunkt lösen sich einzelne Zellen vom ventralen Neuroektoderm dorsad ab, verbleiben aber in dem von Neuropil umgebenen Bereich. Da auch die Zellfortsätze dieser Zellen sich aus dem Bündel des ventralen Neuroektoderms lösen, werden die Bündel dünner. Dies ist die Ursache für die schwächere Ausprägung der Spots auf der Ventralseite späterer Stadien. Die neurogenetischen Zellen beginnen sich im Hemisegment zentral zu konzentrieren (Abb. 20). Zu diesem Zeitpunkt setzt die Axogenese ein, die rasch fortschreitet. Die axonalen Fortsätze einzelner Zellen projizieren sowohl nach lateral als auch nach ventral. Zuerst findet man einzelne Konnektivfasern (siehe III.3), die das gesamte Prosoma longitudinal durchziehen und rasch durch weitere Fasern verstärkt werden. Die ersten auswachsenden

Axone scheinen eine Pionierfunktion einzunehmen und den nachfolgenden Axonen als „Wegweiser“ zu dienen. Ungefähr zeitgleich erfolgt die Entwicklung der Kommissuren. In einem verblüffenden Tempo entwickelt sich das gesamte prosomale Strickleiternnervensystem zwischen dem S3- und dem S4-Stadium (Abb. 36, 37, 38, 39, 40, 41). Nach dem S4-Stadium beginnt die Axogenese auch im Opisthosoma und verläuft von anterior nach posterior.

Im S4-Stadium konzentrieren sich die eingewanderten neurogenetischen Zellen weiter in der Mitte des jeweiligen Hemisegmentes, umfassen insgesamt aber noch einen ausgedehnten Bereich des Hemisegmentes (Abb. 20, 21). Das Neuropil hat sich weiter vergrößert und vermischt sich mit dem Neuropil anderer Cluster (Abb. 21, 22). Die Zellcluster vereinigen sich zu größeren Einheiten, die von Neuropil umgeben sind (Abb. 22, 23). Die Struktur des in jedem Segment angelegten Ganglions wird erkennbar (Abb. 24, 41). Auch während der Entwicklung des Neuropils findet man nach wie vor dünne Zellfortsatzspots im ventralen Neuroektoderm. Sie sind allerdings kleiner geworden, offenbar durch die dorsale Immigration einzelner Zellen. Diese Spots sind zwar nach wie vor gleichmäßig über das Hemisegment verteilt, ihre Anzahl ist jedoch höher als die der sich konzentrierenden Zellcluster im dorsalen Bereich, was durch die dorsale Zellkonzentration in den späteren Ganglien bewirkt wird. Auch im S5-Stadium findet man gleichmäßig verteilte, weiter an Größe abnehmende Spots vor.

III.2.2 α -Tubulin-Markierungen früher Stadien

Wie bereits erwähnt, markiert Phalloidin nicht nur nervöses Gewebe, sondern als Stabilisator von cytoskelettalem F-Aktin alle Zellen, insbesondere auch Muskelfasern. Um zu überprüfen, welche Funktion den Zellen der Immigrationszentren zugeschrieben werden kann, wurden auch bei frühen Embryonalstadien von *Limulus polyphemus* Antikörper-Färbungen gegen acetyliertes α -Tubulin vorgenommen. Auch dieser Antikörper markiert zwar nicht ausschließlich Nervenzellen, eine Expression des Antigens stellt jedoch einen zusätzlichen Hinweis auf neuronale Zusammenhänge dar.

In den untersuchten S3-, S4- und S5-Stadien finden wir bei einer Antikörperfärbung gegen acetyliertes α -Tubulin das gleiche Muster vor wie bei einer Markierung mit TRITC-Phalloidin. Angefärbt sind die Zellen (und ihre Fortsätze) der Immigrationszentren und das Neuropil (Abb. 25, 26).

III.2.3 TRITC-Phalloidin/Anti-HRP-Doppelmarkierungen

Um eine weitere Sicherheit hinsichtlich der neuronalen Natur der Immigrationszentren zu erhalten, wurden Doppelmarkierungen verschiedener Stadien von *Limulus polyphemus* mit TRITC-Phalloidin und einem Anti-HRP-Antikörper vorgenommen. Der Anti-HRP-Antikörper markiert bei allen Arthropodengruppen Neurone (Jan & Jan, 1982; Meier & Reichert, 1990; Whittington *et al.*, 1991; Stollewerk *et al.*, 2001). In den untersuchten *Limulus*-Stadien S1, S3 und S4 zeigten alle phalloidinmarkierten Immigrationszentren

auch eine HRP-Antigen-Expression (Abb. 27), sowohl im embryonalen „Rumpf“ als auch im Kopflappen. Auch das sich entwickelnde Neuropil des S4-Stadiums wird durch beide Marker gefärbt (Daten nicht gezeigt). Diese HRP-Antigen-Expression ist eine Bestätigung dafür, daß es sich bei den Immigrationszentren um neuronale Zellen handelt.

III.2.4 TRITC-Phalloidin/Anti-PH3-Doppelmarkierungen

Einen weiteren wichtigen Aspekt der Neurogenese stellt das Proliferationsmuster der neurogenen Zellen dar. Bei verschiedenen Crustaceen und Hexapoden wird das ZNS via Neuroblasten gebildet. Neuroblasten sind Stammzellen, die bei einer inäqualen Teilung eine Ganglionmutterzelle hervorbringen, die sich nach einer weiteren Teilung in Neurone oder Gliazellen differenziert. Dieser Modus wurde auch „Stammzellenmodus“ oder „stem cell mode“ genannt. Verschiedentlich wird diese Ähnlichkeit als Apomorphie gewertet, die neben weiteren Merkmalen die Crustacea und die Hexapoda in der monophyletischen Gruppe der Tetraconata vereinigt (zusammengefaßt bei Richter, 2002). Die Entwicklung der Immigrationszentren von *Limulus polyphemus* und *Cupiennius salei* sowie *Pholcus phalangioides* zeigt bislang keinerlei Ähnlichkeiten mit Neuroblasten. Da jedoch dem Teilungsmodus der neurogenen Zellen in dieser Frage mehr Bedeutung beigemessen werden muß als der Zellform, wurde das Proliferationsmuster während der Entwicklung des ZNS bei *Limulus polyphemus* untersucht. Hierfür wurden Doppelmarkierungen verschiedener Embryonalstadien (S2, S3, S4) mit TRITC-Phalloidin und dem Mitosemarker Anti-Phospho-Histon3-Antikörper vorgenommen. Das Resultat dieser Markierung ist eine Art Momentaufnahme der Zellen, die sich in der Teilung befinden und darüber hinaus – anhand der Mitosespindeln – eine Feststellung der Richtung, in welche die Teilung erfolgt, ob horizontal oder vertikal.

Eine lückenlose Darstellung gestaltet sich problematisch, da es äußerst schwierig ist, exakt gleichweit entwickelte Embryonen zu finden. Aus diesem Grunde wurden von jedem Stadium zahlreiche Embryonen präpariert und eine möglichst exakte Tendenz des Zellteilungsmusters aus den Daten herausgearbeitet. Es ergeben sich einige Übereinstimmungen zu den Daten bei *Cupiennius salei* (Stollewerk *et al.*, 2001), aber auch einige Unterschiede. Auch die ersten Vorversuche dieser Doppelmarkierung bei *Limulus polyphemus* (Mittmann, 2002) werden durch die nachfolgenden Daten ergänzt und teilweise modifiziert.

Im S2-Stadium von *Limulus polyphemus* finden wir zahlreiche mitotische Zellen über den ganzen Embryo verteilt (Abb. 28), auch im S3-Stadium teilen sich zahlreiche Zellen (Abb. 29). Ob in früheren Stadien eine geringere Anzahl Mitosen stattfindet, wie dies bei *Cupiennius salei* beschrieben wurde (Stollewerk *et al.*, 2001), ist nicht bekannt. Im S2-Stadium finden die meisten Teilungen in der ventralsten Zellschicht des Neuroektoderms statt, häufig in direkter Nachbarschaft zu den Immigrationszentren. Mitotische Teilungen in der ventralsten Zellschicht des Neuroektoderms in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Immigrationszentren wurden in allen vier untersuchten Stadien vorgefunden. Diese Teilungen erfolgen immer in horizontale Richtung. Insbesondere in frühen, aber auch in

späteren Stadien findet man immer wieder einen Immigration spot von mehreren mitotischen Zellen umgeben (Abb. 30).

Im S3-Stadium finden wir diese ventralen Teilungen ebenfalls, darüber hinaus aber weitere in dorsaleren Zellschichten. Auch einige Flaschenzellen in Immigrationszentren teilen sich mitotisch (Abb. 31, 32). Diese Proliferationen scheinen in der Regel ebenfalls horizontal zu verlaufen; nur in einem Fall wurde eine vertikale Teilung beobachtet (Abb. 33).

Im S4-Stadium nimmt die mitotische Teilungsfrequenz ab (Abb. 34), scheint dafür aber im Bereich der sich entwickelnden Ganglien eine Symmetrie entlang der Transversalachse zu zeigen (Abb. 34, 35). Nach wie vor finden wir horizontal verlaufende Mitosen in der ventralsten neuroektodermalen Zellschicht, häufig benachbart zu den Zellfortsätzen der Immigrationszentren (Abb. 30). Darüber hinaus finden jedoch auch Teilungen in Zellen direkt ventral des sich formierenden Neuropils statt. Es scheinen sich aber bei weitem nicht alle Zellen der Immigrationszentren zu teilen, sondern nur einzelne.

Trotz gewisser Unterschiede zu *Cupiennius salei* (Stollewerk *et al.*, 2001) konnte auch bei *Limulus polyphemus* keine eindeutige Korrelation zwischen Zellteilungen und der Immigration neurogenetischer Zellen beobachtet werden. Weiterhin scheinen sich mitnichten alle in Immigrationszentren organisierten neurogenetischen Zellen noch ein- oder mehrmals zu teilen, wie dies bei Neuroblasten der Fall wäre.

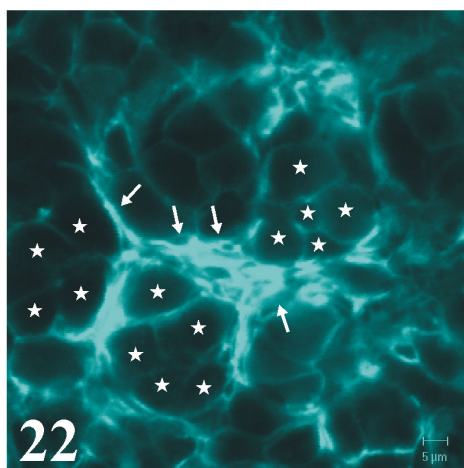
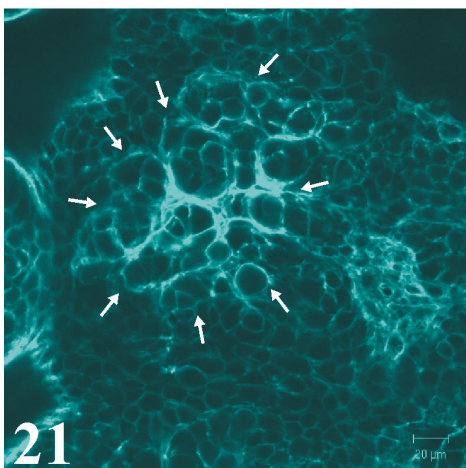
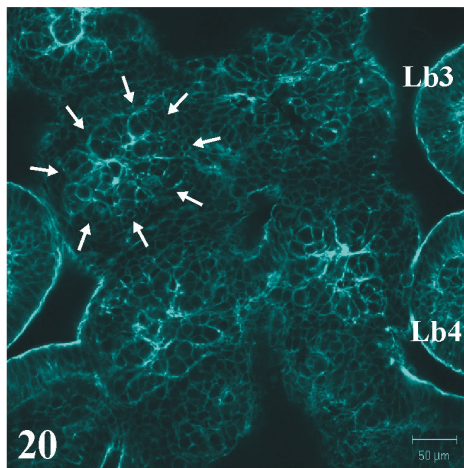
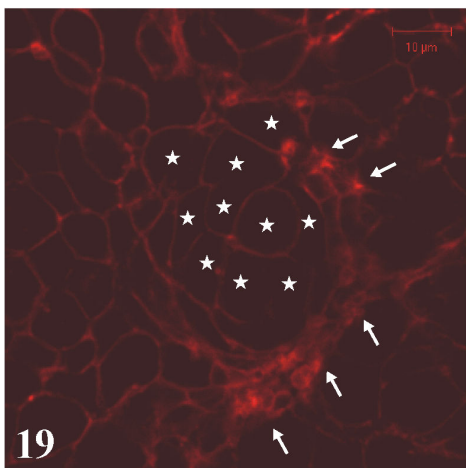
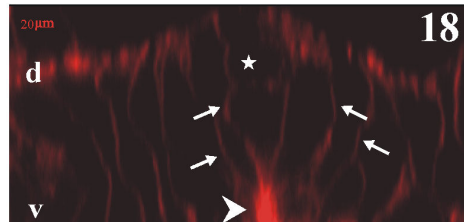
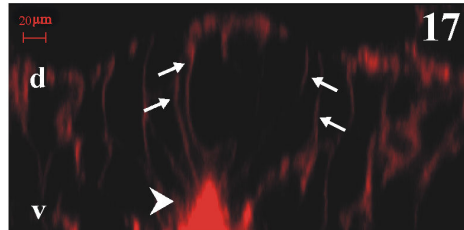
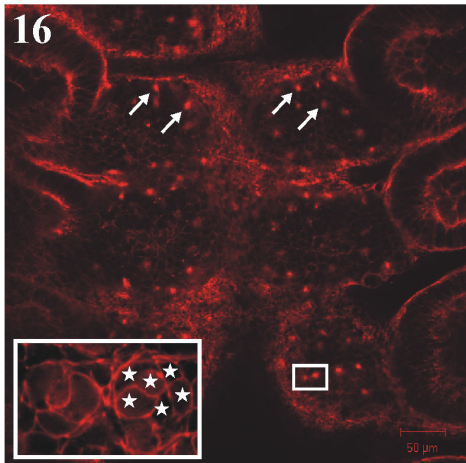
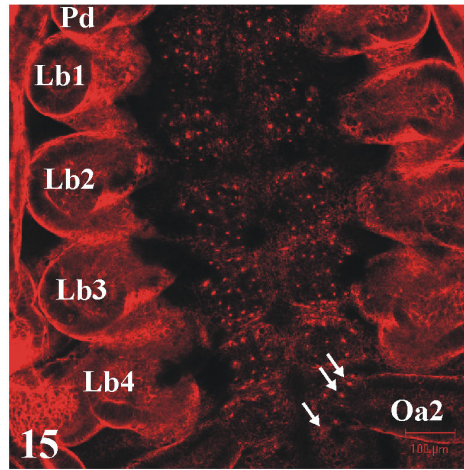
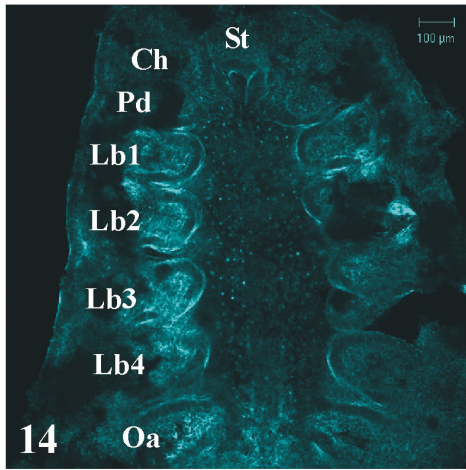


Abb. 14 *Limulus polyphemus* (S2; TRITC-Phalloidin). In den prosomalen Hemisegmenten finden sich zahlreiche fluoreszenz markierte Spots, die die Position der Immigrationszentren anzeigen. Im Opisthosoma setzt die Neurogenese erst später ein. **Abb. 15** *Limulus polyphemus* (S4; TRITC-Phalloidin). In späteren Stadien nimmt die Anzahl der Spots/Immigrationszentren zu. Die Anordnung in Säulen und Reihen ist deutlich. Auch im Opisthosoma findet man nun Immigrationszentren (Pfeil). **Abb. 16** *Limulus polyphemus*, drei Prosoma-Segmente (S4; TRITC-Phalloidin). Fokussiert man durch die Spots hindurch, stößt man auf blümchenförmig angeordnete Zellen (*), die etwas größer sind als die sie umgebenden. **Abb. 17/18** *Limulus polyphemus*, Querschnitt (S4; TRITC-Phalloidin). Ein Querschnitt durch ein Immigrationszentrum zeigt, daß die beteiligten Zellen eine flaschenförmige Gestalt haben (Pfeil). Die fluoreszenten Spots an der ventralen Seite (v) kommen durch gebündelte Zellfortsätze zustande (Pfeilspitze). **Abb. 19** *Limulus polyphemus*, Neuropilbildung (S4; TRITC-Phalloidin). Die blümchenförmigen Zellcluster (*) sind von sich entwickelndem Neuropil umgeben (Pfeil). **Abb. 20** *Limulus polyphemus*, Clusterkonzentration (S4; TRITC-Phalloidin). Die von Neuropil umgebenen Cluster konzentrieren sich in jedem Hemisegment (Pfeil). **Abb. 21/22** *Limulus polyphemus*, Neuropilkonzentration (S4; TRITC-Phalloidin). Während der Konzentration der Immigrationszentren nimmt die Neuropilbildung weiter zu. Die Neuropilfasern vereinigen sich zu dickeren Strängen (Pfeile). Ch = Chelicere; d = dorsal; Lb = Laufbein; Oa = Opisthosomalanhalt; Pd = Pedipalpe; St = Stomodaeum; v = ventral.

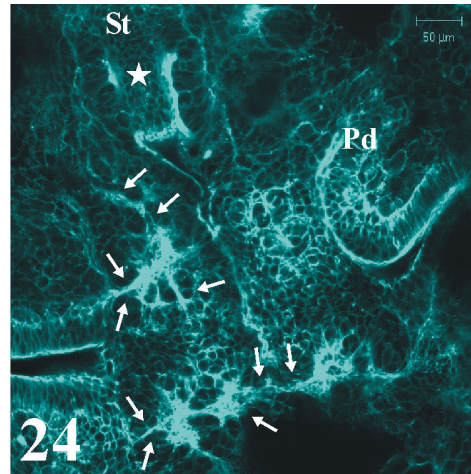
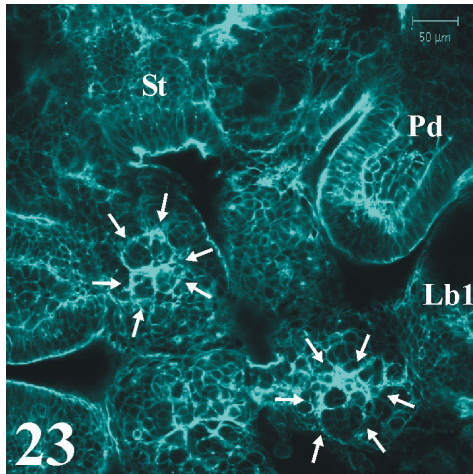


Abb. 23 *Limulus polyphemus*, Neuropilkonzentration (S4; TRITC-Phalloidin). Die Zellcluster vereinigen sich zu größeren, neuropilumgebenden Einheiten (Pfeile). **Abb. 24** *Limulus polyphemus*, Ganglionbildung (S4; TRITC-Phalloidin). Im weiteren Entwicklungsverlauf wird die Ganglionstruktur in jedem Hemisegment erkennbar, erste Konnektive und Kommissuren bilden sich (Pfeil). In der Stomodaeumwand (St) bilden sich die Stomatogastrischen Ganglien (★). Lb= Laufbein; Pd = Pedalpalpe.

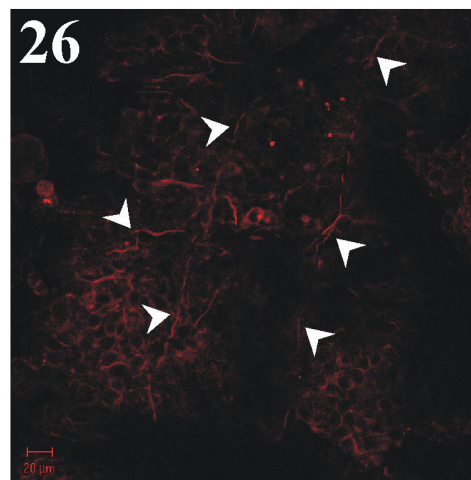
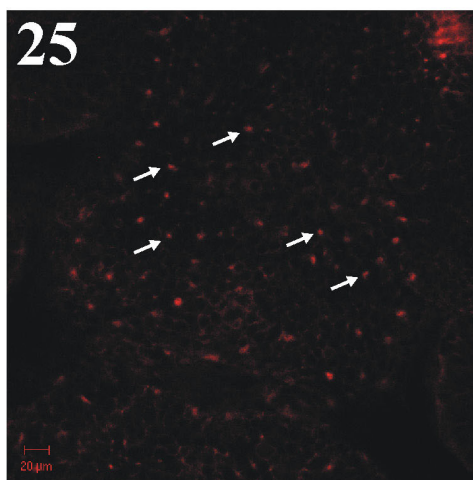


Abb. 25/26 *Limulus polyphemus* Neurogenese (S3/S4; α -Tubulin). Fokussiert man durch die Segmente eines Embryos hindurch, so findet man auf der Ventralseite zahlreiche markierte Spots der Immigrationszentren (Pfeile). Weiter dorsal in dem selben Embryo haben sich jedoch schon erste Fasern der Konnektive und Kommissuren gebildet (Pfeilspitzen).

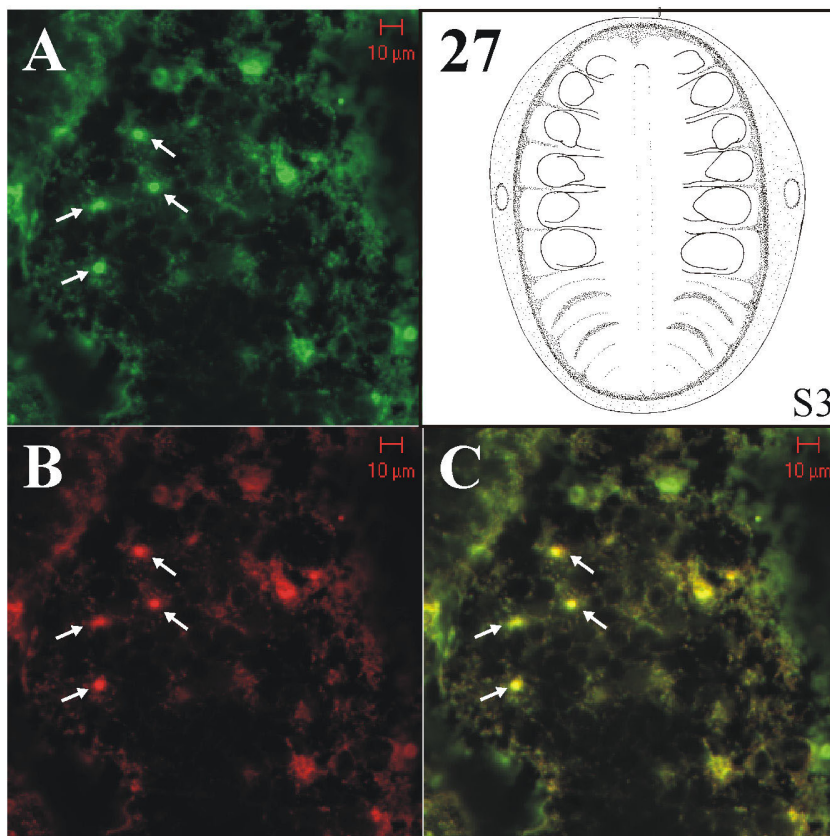


Abb. 27 *Limulus polyphemus* (S3; TRITC-Phalloidin/Anti-HRP). Bei der Doppelmarkierung (C, Pfeile) zeigen alle Immigrationszentren sowohl eine Markierung mit Anti-HRP (A, Pfeile) als auch mit TRITC-Phalloidin (B; Pfeile).

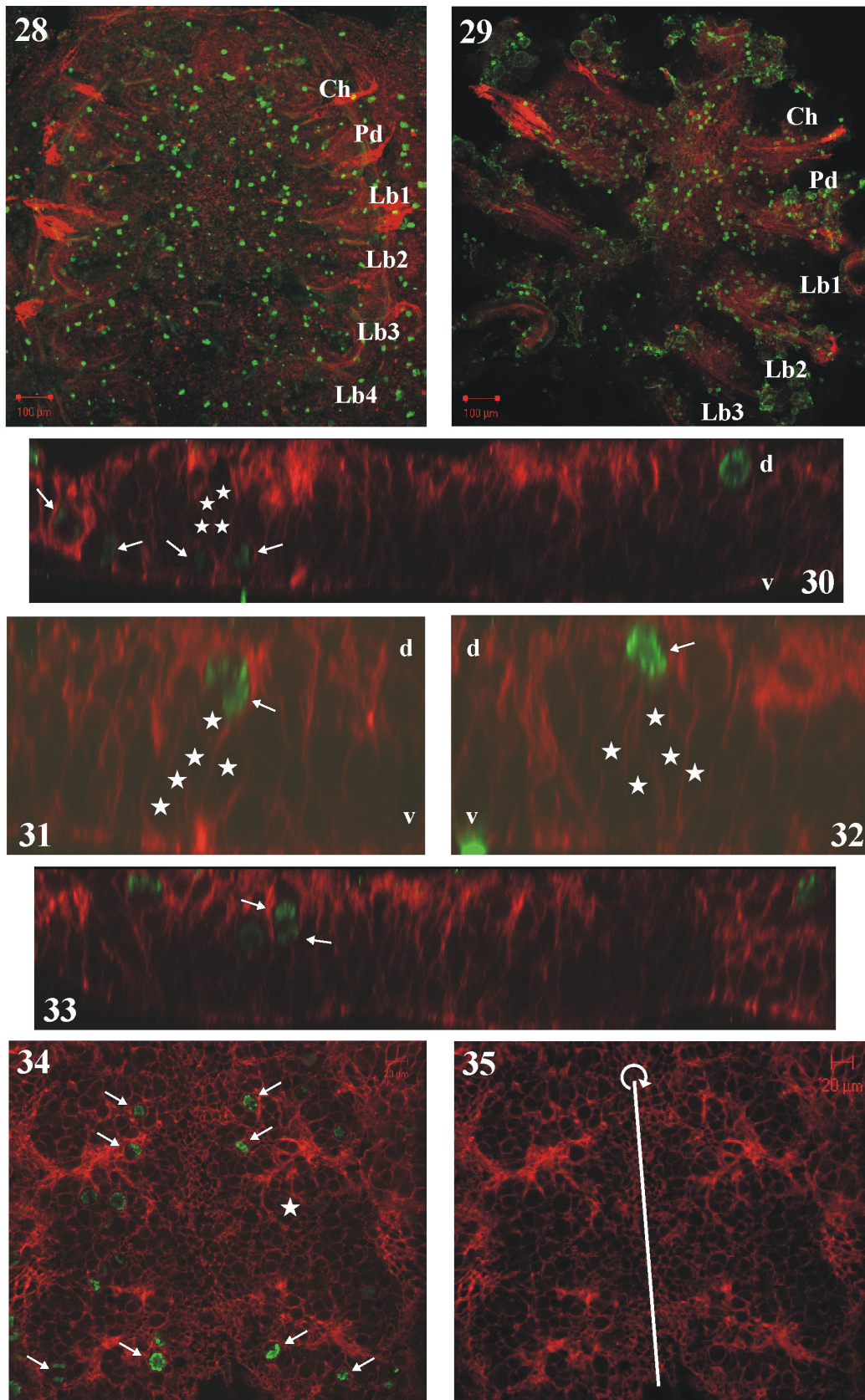


Abb. 28/29 *Limulus polyphemus* (S2/S3). Im beiden Stadien findet man zahlreiche mitotische Zellen im gesamten Embryo. **Abb. 30** *Limulus polyphemus*, Querschnitt (S2). Die meisten Mitosen finden im ventralsten Neuroektoderm statt, immer wieder auch direkt benachbart zu den Immigrationszentren (Pfeil; ★ = Flaschenförmige Zellen). **Abb. 31/32** *Limulus polyphemus* (S3). Neben den ventralen Mitosen findet man auch einige in dorsaleren Zellschichten über den Immigrationszentren (Stern). Auch einige flaschenförmige Zellen teilen sich (Pfeil). **Abb. 33** *Limulus polyphemus* (S3). Die meisten Mitosen verlaufen horizontal, äußerst selten findet man auch eine vertikale Teilung (Pfeile). **Abb. 34/35** *Limulus polyphemus* (S4). In späteren Stadien nimmt die Teilungsfrequenz ab, zeigt aber eine Symmetrie (Pfeile) entlang der Transversalachse. (★) die mitotischen Zellen sind außerhalb der Focusebene. Ch = Chelicere; d = dorsal; Lb= Laufbein; Pd = Pedipalpe; v = ventral. Alle Markierungen: TRITC-Phalloidin/Anti-PH3.

III.3 DER AXONALE VERLAUF DES EMBRYONALEN ZNS VON *LIMULUS POLYPHEMUS*

Die nachfolgend dargestellten Daten über den axonalen Verlauf des embryonalen ZNS von *Limulus polyphemus* waren ursprünglich nicht als Teil dieser Arbeit geplant. Da ich jedoch im Verlauf der vier Sammlungsperioden mindestens 1200 Embryonen der verschiedenen Stadien präpariert und mit unterschiedlichen Markern untersucht habe, ergab sich ein recht umfassendes Bild über etliche Aspekte der Neurogenese, die jedoch nicht alle weiter verfolgt werden konnten. Insbesondere aus den α -Tubulin markierten Embryonen ließ sich die Entwicklung des axonalen Skeletts recht gut nachvollziehen. Das Bild, das sich durch die Kombination dieser Daten ergibt, beansprucht keineswegs Vollständigkeit, auch nicht im Ansatz. Darüber hinaus sind die hier verwendeten Methoden nur bedingt zur Untersuchung der Axogenese geeignet, da keine Einzelzellmarkierungen vorgenommen werden konnten und somit der Werdegang eines einzelnen Axons nicht weiter beachtet wurde.

Dennoch erachte ich diese Daten für so interessant, daß mir ihre Darstellung gerechtfertigt zu sein scheint – insbesondere, da keinerlei vergleichbaren Untersuchungen zu *Limulus polyphemus* vorliegen. Ich verstehe diesen Abschnitt als reine Beschreibung, als den Versuch, zufällig gewonnene Bilder und Daten zu einem Gesamtablauf über die Axonbildung zusammenzusetzen. Auf eine eingehende vergleichende Untersuchung mit anderen Arthropoden wurde wegen der Zufälligkeit der Daten verzichtet. Vergleichende Aspekte wurden direkt in den Ergebnisteil eingefügt, stellen aber ebenfalls eher zufällige Beobachtungen dar als durch systematische Durchforstung vorhandener Daten zustande gekommene Erkenntnisse. Somit soll dieser Abschnitt eher als Anregung für weitere Untersuchungen dienen.

*

Hat die Axogenese bei *Limulus polyphemus* einmal begonnen, dann geht sie des weiteren außerordentlich schnell vonstatten und ist aus diesem Grunde schwer in einzelnen Schritten darstellbar (dieser rasante Verlauf der Axogenese scheint ebenfalls bei *Cupiennius salei* vorzukommen (Stollewerk, persönliche Mitteilung)). Selbst bei Embryonen des gleichen Stadiums findet man immense Unterschiede hinsichtlich des neurogenetischen Fortschritts. Darüber hinaus scheint eine gewisse zeitliche Varianz auftreten zu können, die sich beispielsweise bei der Axogenese im Opisthosoma bemerkbar macht. Wegen dieses geringen und teils variablen Zeitfensters war es nicht möglich, festzustellen, ob die Axogenese in einem bestimmten Segment beginnt, beispielsweise im oder vor dem Chelicerensegment oder auch im Segment des zweiten Laufbeinpaars, das häufig den anderen Anhangspaaren in zeitlicher Hinsicht etwas voraus ist, oder in allen prosomalen Segmenten gleichzeitig. Ich beginne deshalb mit der Darstellung in einem Stadium, in dem sich die ersten longitudinalen Konnektive bereits organisiert haben. Die Axogenese ist ein kontinuierlicher Prozeß; trotzdem habe ich versucht, besonders häufig zu beobachtende Entwicklungszustände bestimmten Stadien zuzuordnen. Für die Darstellung der Entwicklungsschritte werden verschiedene Marker verwendet, TRITC-konjugiertes

Phalloidin für die frühe Axogenese, Antikörper gegen acetyliertes α -Tubulin und *Drosophila*-synapsin (Synorfl) für spätere Stadien.

Wie im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, beginnt die Axogenese ungefähr im S3-Stadium. Einzelne Fasern der longitudinalen Konnektive ziehen durch das gesamte Prosoma (Abb. 36, 37). Rasch gesellen sich weitere Axone dazu. Offenbar fungieren die zuerst entstandenen als Pionieraxone, als „Wegweiser“, wie dies auch bei Insekten und Crustaceen der Fall ist (unter zahlreichen Artikeln siehe Jacobs & Goodman, 1989; Whittington *et al.*, 1991, 1993; Goodman & Doe, 1993; Boyan *et al.*, 1995, 2003; Whittington, 1996; Campos-Ortega & Hartenstein, 1997; Hidalgo & Brand, 1997; Nassif *et al.*, 1998; Parsons *et al.*, 2003). Zeitgleich bahnen sich erste kommissurale Axone ihren Weg zum gegenüberliegenden Konnektivstrang (Abb. 37). Auch diese Fasern werden bald durch weitere hinzukommende verstärkt. Einzige zeitliche Ausnahme stellt vermutlich die Chelicerenkommissur dar, die sich offenbar erst zu einem etwas späteren Zeitpunkt entwickelt.

Die Innervierung der Chelicere erfolgt im S3-Stadium noch durch laterale Projektionen der Axone des zugehörigen Ganglions (Abb. 38). Sobald die Chelicerenknospen wenig später ihre seitliche Position verlassen und in mediane Richtung wandern, erfolgt die Innervierung in ventraler Richtung; im weiteren Entwicklungsverlauf sind die Ganglien in der Dorsalansicht nicht mehr zu sehen und können nur via konfokaler Mikroskopie ausgemacht werden. Der zum Bereich des Chelicerenganglions gehörende Intestinalnerv scheint zu diesem Zeitpunkt noch nicht entwickelt zu sein. Mediolateral des Chelicerenganglions findet man in der Wand des sich invaginierenden Stomodaeums zahlreiche Anti- α -Tubulin-markierte Fortsätze, die mit dem longitudinalen Strang auf Höhe des Chelicerenganglions Kontakt aufnehmen (Abb. 39, 40). Es wird von diesen kontaktierenden Axonen ein Bereich abgedeckt, der anterior des Chelicerenganglions beginnt und posterior desselben endet.

Anterior des Chelicerenganglions findet sich das Protocerebralganglion (Abb. 38, 39, 41); die dazugehörige Kommissur oder Protocerebralbrücke ist erst durch einzelne Fasern vertreten (außerhalb der Focusebene; Pfeilspitzen). Ob auch schon Fasern des praestomodaeal verlaufenden Anteils der Chelicerenkommissur beteiligt sind, konnte mit den hier angewendeten Methoden und wegen technischer Schwierigkeiten, Einzelzellmarkierungen vorzunehmen, nicht überprüft werden. Der poststomodaeal verlaufende Anteil der Chelicerenkommissur scheint sich zu einem späteren Zeitpunkt zu entwickeln. Anterior der Protocerebralbrücke setzen sich die Kommissuren in den Bereich des sich entwickelnden Gehirns fort (Abb. 39). Ein Teil des Lobus opticus ist bereits ausgebildet, weitere Ansammlungen neurogenetischer Zellen finden sich median der beiden optischen Loben. Welche Gehirnabschnitte sich aus diesen Zellansammlungen im einzelnen entwickeln, ist zu diesem Zeitpunkt nicht zu erkennen (Abb. 41; Pfeilspitzen).

In allen übrigen prosomalen Segmenten sind zumindest erste Konnektiv- und Kommissurfasern zu erkennen. Im Opisthosoma finden sich weder Konnektive noch Kommissuren, lediglich eine hemisegmentale Konzentration neurogenetischer Zellcluster ist auszumachen.

Die weitere Axogenese vollzieht sich sehr rasch (Abb. 42, 43). Bereits im S4-Stadium findet man massive Konnektive und Kommissuren vor, wobei letztere einen breiten

Bereich einzelner oder gebündelter Fasern umfaßt, die sich im späteren Entwicklungsverlauf weiter differenzieren. Der für Arthropoden charakteristische circumoesophageale Neuropilring ist bereits deutlich ausgeprägt. Das Protocerebrum besteht aus den beiden optischen Loben und einem massiven Nervenstrang, der die Loben via Protocerebralbrücke verbindet. Ungefähr auf der Hälfte der Länge zwischen Lobus opticus und Protocerebralbrücke zweigen auf beiden Seiten die Neurone, aus denen sich später die großen Medianloben differenzieren, nach median ab. Auch jeweils ein Faserbündel hat an diesem Bereich des Tractus seinen Ursprung und verläuft bis zum anteroventralen Rand des Embryos (Abb. 43). Dort innervieren die Axone später die Medianaugen und vereinigen sich wieder (Abb. 43).

Posterior des Protocerebrums ungefähr in der Mitte des circumoesophagealen Neuropils liegen die Chelicerenganglien (Abb. 42, 43, 47). Sowohl der anterior als auch der posterior verlaufende Anteil der Chelicerenkommissuren ist teilweise ausgebildet. Die Chelicereninnervierung selbst verläuft nach ventral. Die posteriore Grenze des circumoesophagealen Neuropilrings bildet das Pedipalpenganglion mit seiner poststomodaealen Kommissur, die noch aus relativ wenigen Fasern besteht (Abb. 43); diese sind noch nicht in die späteren vier Stränge organisiert.

Mediolateral der Chelicerenganglien beginnen sich die Stomatogastrischen Ganglien in der lateralen Wand des Stomodaeums zu entwickeln (Abb. 40). Verbindungen zum ZNS sowie zum gegenüberliegenden Stomatogastrischen Ganglion sind erst durch wenige Fasern oder noch gar nicht vertreten (Abb. 42, 43).

Im folgenden Entwicklungsverlauf differenziert sich das ZNS rasch weiter (Abb. 44). Der anteriore Abschnitt des ZNS, der den „Kopf“ innerviert, ist ebenfalls weiter entwickelt und zeigt eine für Arthropoden charakteristische Anordnung um das Stomodaeum. Eine genaue Beschreibung dieses Stadiums findet sich in Abschnitt III.4 und wird hier deshalb nicht gesondert aufgeführt.

Die Strickleiter aus Konnektiven und Kommissuren dehnt sich bis ins Opisthosoma aus und reicht ungefähr bis zum Ganglion des vierten Opisthosomalanhanges, umfaßt also Chilaria, Genitaloperculum und die folgenden zwei Paar Blattbeine (Abb. 44). Im Opisthosoma erfolgt die Axogenese von anterior nach posterior. Sind in diesem Stadium die Ganglien und Innervierungen der Chilaria und der zwei darauffolgenden Anhänge recht distinkt und bestehen aus vielfaserigen Bündeln, sind die Konnektive der darauffolgenden Segmente erst dünn und bestehen aus einer oder nur wenigen Fasern.

Ein charakteristisches Ganglion dieses Stadiums ist in gewisser Hinsicht zweigeteilt. Der anteriore Teil besteht aus dem lateral projizierenden Hämalnerv/Intestinalnerv (siehe auch Film 4), der sich weiter verzweigt und teils Rezeptoren am Prosomarand innerviert, teils innere Organe wie beispielsweise das Herz (Abb. 44, 45, 46). Der größere posteriore Teil des Ganglions innerviert über einen massiven Nervenstrang, der sich rasch in zwei Arme verzweigt, die sich ihrerseits wieder weiterverzweigen können, die Extremitäten. Ein Zweig innerviert die Gnathobase, ein Zweig, der Große Beinnerv, zieht sich bis in die Spitze der Extremität, wohingegen der Kleine Beinnerv sich nur bis zum Ansatz der Klaue zieht. Die Verzweigungen der opisthosomalen Anhänge unterscheiden sich in ihrem Muster, wurden aber nicht genauer untersucht. Auch bei der nach ventral projizierenden Chelicere konnte diese Dreistrahligkeit nicht mit Sicherheit ausgemacht werden. Die

Konnektive und die Ganglien beider Seiten sind über mehrere, häufig über drei oder vier Kommissuren miteinander verbunden (Abb. 45, 46). Die anteriorste Kommissur setzt sich aus Fasern des Hämalnervs und aus Fasern des die Beine innervierenden Nervenstranges zusammen. Die drei posterioren Kommissuren scheinen nur von letzterem Bereich gespeist zu werden. Darüber hinaus ziehen Fasern von dem die Extremitäten innervierenden Ganglionbereich nach posterior und vermengen sich auf der Hälfte und auf Dreiviertel der Strecke zum nächsten Ganglion wieder mit den longitudinalen Konnektiven. Einige Fasern ziehen direkt von einem Ganglion in das nächste.

In späteren Stadien beginnen die Verschmelzungsprozesse der prosomalen ZNS-Abschnitte, die in dem massiven, ringförmigen „Gehirn“ der schlüpfenden Larve und des adulten Tieres enden. Diese Stadien wurden in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt.

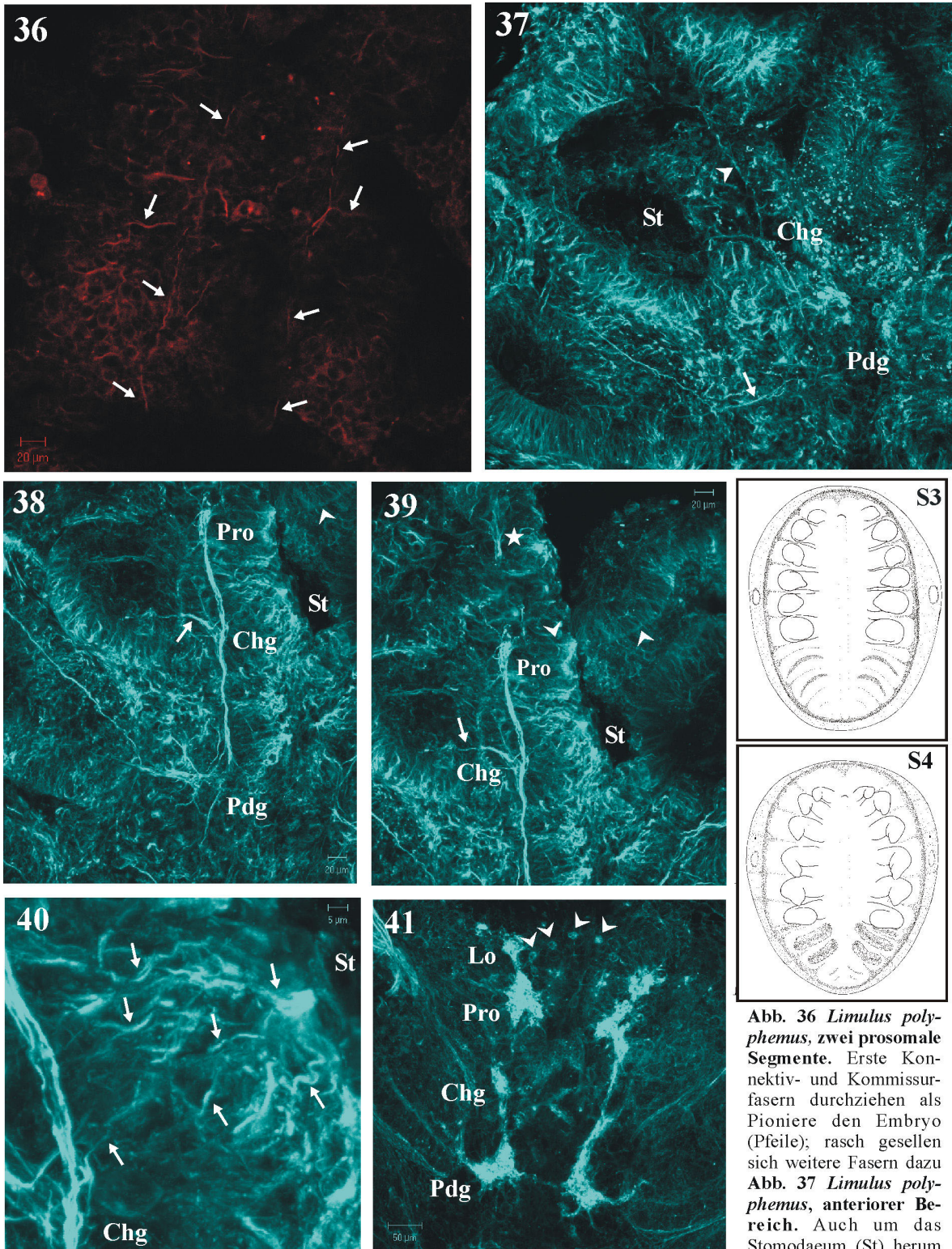


Abb. 36 *Limulus polyphemus*, zwei prosomale Segmente. Erste Konnektiv- und Kommissurfasern durchziehen als Pioniere den Embryo (Pfeile); rasch gesellen sich weitere Fasern dazu **Abb. 37** *Limulus polyphemus*, anteriorer Bereich. Auch um das Stomodaeum (St) herum

findet man einzelne dünne Faserstränge, die Kommissur (Pfeil) zwischen den Pedipalpenganglien (Pdg) besteht nur aus einer Faser. **Abb. 38** *Limulus polyphemus*, Chelicereninnervierung. Eine laterale Projektion (Pfeil) vom Chelicerenganglion (Chg) innerviert die Chelicere. Mittlerweile sind die Faserstränge verdickt, die Konnektive zwischen Pedipalpenganglion, Chelicerenganglion und Protocerebrum (Pro) sind deutlich zu sehen. **Abb. 39** *Limulus polyphemus*, Protocerebrum. Einzelne, dünne Fasern der Protocerebralbrücke (Pfeilspitzen) überqueren das Stomodaeum. Der (★) markiert den auswachsenden optischen Nerv. **Abb. 40** *Limulus polyphemus*, Stomatogastrische Nerven. In der Stomodaeumwand entwickeln sich zahlreiche Axone, die in Richtung Chelicerenganglion streben (Pfeile). **Abb. 41** *Limulus polyphemus*, „Kopf“ganglien. Massive Ganglien entwickeln sich rasch um das Stomodaeum. Anterior des Protocerebrums entwickeln sich beidseitig der Lobus opticus (Lo) sowie weitere Sehnerven. Zentral finden sich Median auf Höhe des Lobus opticus finden sich sechs markierte Zellcluster (Pfeilspitzen zeigen auf vier); was aus diesen wird, ist nicht bekannt. Alle Stadien: S3/S4; alle Markierungen: α -Tubulin.

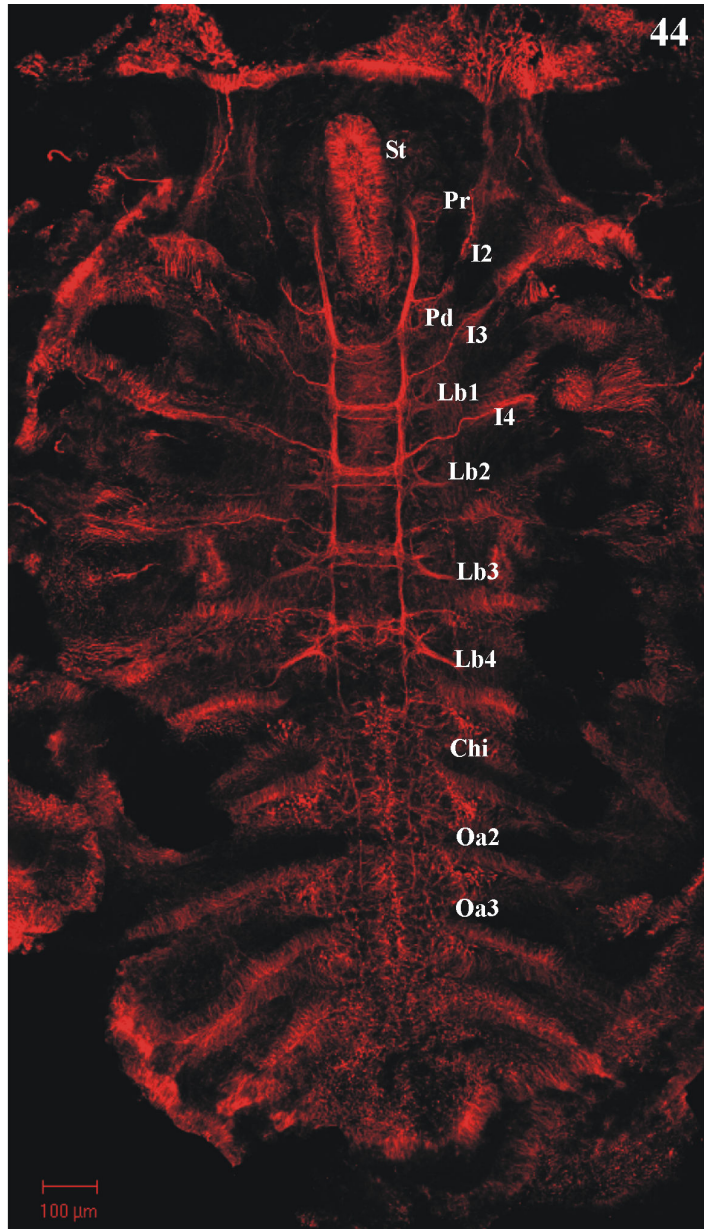
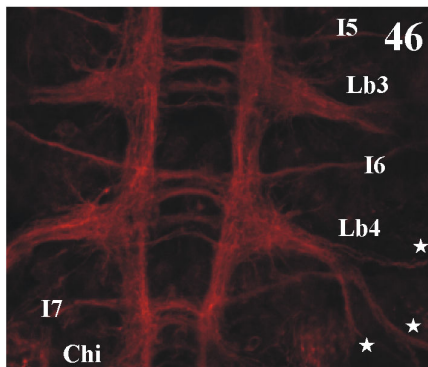
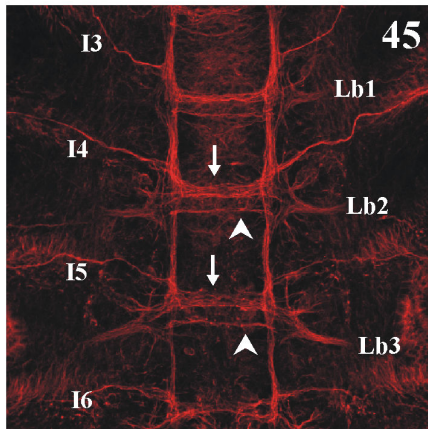
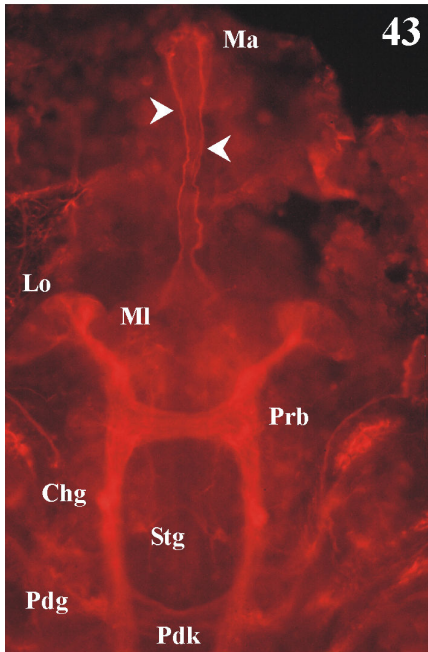
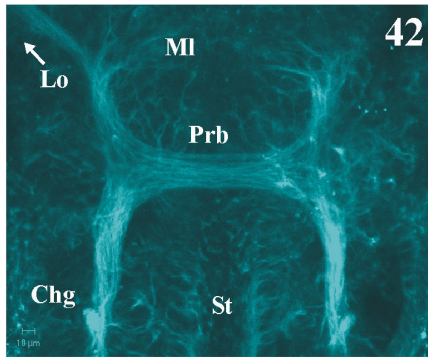


Abb. 42 *Limulus polyphemus*, Kopfneuropil (S3/S4). Der Neuropilring hat sich um das Stomodaeum (St) gebildet. Anterior liegt die Protocerebralbrücke (Prb), von der ausgehend die Medianloben (MI) und die optischen Loben (Lo) innerviert werden. Lateral des Stomodaeums folgt das Chelicerenganglion (Chg), dessen praestomodaeale Kommissur teilweise ausgebildet ist, von den wenigen poststomodaeal verlaufenden Kommissurfasern sind erst wenige entwickelt. Abb. 43 *Limulus polyphemus*, Neuropilring (S4). Im Verlauf der weiteren Entwicklung wird der circumoesophageale Neuropilring massiver, die Stomatogastrischen Ganglien (Stg) sowie das gesamte SNS bildet sich weiter aus. Der Lobus opticus (Lo) ist deutlich ausgeprägt, unterhalb der Medianloben (MI) kann man die Innervierung der Medianaugen (Ma) sehen (Pfeilspitzen). Abb. 44 *Limulus polyphemus*, ZNS (S4). Die Gesamtansicht des ZNS gibt einen Eindruck in die Größenverhältnisse. Deutlich sieht man, dass die Axonbildung von anterior nach posterior erfolgt, im Opisthosoma bestehen selbst die Konnektive zu diesem Zeitpunkt nur aus dünnen Fasersträngen und Einzelfasern. Die Chelicereninnervierung erfolgt nach ventral und ist deshalb nicht sichtbar. Abb. 45 *Limulus polyphemus*, Segmentale Innervierung (S4). Ein massiver Nervenstrang innerviert jeweils die Laufbeine (Lb). Anterior der Ganglien ziehen die Intestinalnerven (I) nach lateral. Die Kommissuren bestehen aus einem breiteren, anterioren Faserbündel (Pfeil) sowie einem dünneren posterioren (Pfeilspitze). Abb. 46 *Limulus polyphemus*, Laufbeininnervierung, Detail (S4). Die Nervenstränge der Laufbeine (Lb) teilen sich in weitere drei Stränge (★). Häufig findet man vor der Fusion vier Kommissurstränge. Alle Markierungen: α -Tubulin Chg = Chelicerenganglion; Chi = Chilaria; I = Intestinalnerv; Lb = Laufbein; Oa = Opisthosomalanhalt; Pd = Pedipalpe; Pdg = Pedipalpenganglion; Pdk = Pedipalpalkommissur; Prb = Protocerebralbrücke; St = Stomodaeum.

III.4 ANALYSE DER KOPFSEGMENTIERUNG BEI CHELICERATEN UND WEITEREN ARTHROPODEN MITTELS VERSCHIEDENER NEURONALER MARKER

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist sich die Fachwelt seit über 100 Jahren uneins über die Frage, aus wie vielen Segmenten sich der Arthropodenkopf zusammensetzt. Durch zahlreiche Fusionen ist die Anzahl der Segmente im adulten Tier unmöglich nachzuweisen, weswegen auf embryologische Daten zurückgegriffen wurde, genauer gesagt auf die Entwicklung des Kopfes mitsamt seiner Innervierung bei Cheliceraten, Crustaceen und Insekten. Untersucht wurden *Limulus polyphemus*, *Triops cancriformis* und *Lepisma saccharina*. Als besonders geeignet stellte sich die Markierung mit α -Tubulin heraus. Auf diese Weise konnten sowohl die Gehirnstruktur im Kopf als auch die Entwicklung einzelner Ganglien und die Verbindung zum Stomatogastrischen Nervensystem untersucht werden. Alle auf diese Weise gewonnenen Daten wurden untereinander und mit den bereits vorhandenen Literaturdaten verglichen.

III.4.1 *Limulus polyphemus*

III.4.1.1 Der circumoesophageale Neuropilring

Der anteriore Gehirnabschnitt ist bei *Limulus polyphemus* in einem circumoesophagealen Neuropilring organisiert; er zeigt große Ähnlichkeit mit dem korrespondierenden Bereich anderer Arthropoden (Harzsch, *et al.*, 1997; Mittmann & Scholtz, 2003). Den anteriorsten Bereich dominiert das Protocerebrum mit den beiden prominenten optischen Loben (Abb. 47, Film 5). Diese sind über einen ausgeprägten Nervenstrang und die Protocerebralbrücke miteinander verbunden (Abb. 47). Ungefähr in der Mitte dieses Stranges zweigen die großen Medianloben ab (Abb. 47). Auch die Axone der Medianaugen nehmen hier ihren Ursprung (Abb. 43). Diese vereinigen sich im anteroventralsten Bereich des Embryos in einer größeren Anzahl Neurone. Die Protocerebralbrücke bildet das anteriore Ende des circumoesophagealen Neuropilringes.

Posterior des Protocerebrums folgen die Chelicerenganglien; sie befinden sich ungefähr in der Mitte der circumoesophagealen Konnektive (Abb. 47). Der Hauptteil der Chelicerenkommissur verläuft nach anterior und vermischt sich mit der Protocerebralbrücke (Abb. 48, 49). Einige Fasern der Chelicerenkommissur ziehen jedoch nach posterior und bilden zusammen mit kommissuralen Fasern des Pedipalpenganglions den anterioren Abschnitt der Pedipalpenkommissur (Abb. 49, 51). Somit ist die Chelicerenkommissur in zwei Teile gespalten, einen anterior und einen posterior verlaufenden; sie umgibt das Stomodaeum kreisförmig. Die Innervierung der Cheliceren erfolgt in ventrale Richtung. Diese ventrale Projektionsrichtung des Chelicerennerves wird ab dem embryonalen S3-Stadium bis zum adulten Tier beibehalten.

Den posterioren Abschluß des circumoesophagealen Ringes bilden die Pedipalpenganglien mit ihrer poststomodaealen Kommissur (Abb. 51). Die Kommissur besteht aus vier Faserbündeln, wobei einige Fasern der Chelicerenkommissur dem anteriorsten Bündel

beigemengt sind (Abb. 47). Der prominente, die Pedipalpen innervierende Strang verläuft nach lateral und verzweigt sich rasch in die zumindest für die prosomalen Anhänge charakteristischen Zweige.

Zwei paarige Nervenfaserbündel entspringen dem circumoesophagealen Konnektiv, eines anterior des Chelicerenganglions, eines anterior des Pedipalpanglions (Abb. 50). Diese nach anterolateral verlaufenden Bündel werden als Intestinalnerven bezeichnet, wobei verschiedene Autoren unterschiedliche Bezeichnungen wählen. Die Intestinalnerven entspringen jedem intergangliären Konnektivbereich des Prosomas und – soweit untersucht – auch des Opisthosomas. Anterior des Chilariaganglions und in einem etwas späteren Stadium auch anterior der beiden darauf folgenden Blattbeinpaare findet sich jeweils ein Paar Intestinalnerven (Abb. 46). Auch diese Faserbündel verzweigen sich rasch, wobei ein Zweig zum sogenannten Hämalnerv wird (Patten & Redenbaugh, 1899; Hanström, 1928). Auf beiden Seiten der circumoesophagealen Konnektive finden sich globuläre Strukturen aus Neuronen, die verschiedenen Segmenten angehören (Abb. 50). Lateral der Protocerebralbrücke liegt eine große globuläre Einheit, die sich aus mindestens 50 Neuronen zusammensetzt. Diese Einheit ist in kleinere Neuronenbündel unterteilt, deren Axone oder Axonstränge allesamt auf Höhe der Protocerebralbrücke in die ZNS-Konnektive eintreten (Abb. 50). Posterior dieses Protocerebralgglomerulus folgt ein kleinerer Glomerulus unbekannter segmentaler Zugehörigkeit (Abb. 50). Darauf folgen zwei kleinere Glomeruli, die dem Chelicerenganglion zuzuordnen sind (Abb. 50). Sie bestehen jeweils aus ungefähr 15 bis 25 Neuronen, deren Axone direkt oder in Bündel vereinigt in den die Chelicere innervierenden Nervenstrang münden (Abb. 50). Posterior dieses zweigeteilten Chelicerenganglions entspringt der zweite Intestinalnerv (Abb. 50), gefolgt von den Neuronen des Pedipalpanglions.

III.4.1.2 Das Stomatogastrische Nervensystem

Der circumoesophageale Neuropilring umgibt das invaginierende Stomodaeum. Das zum Stomodaeum gehörige Nervensystem ist das sogenannte Stomatogastrische Nervensystem (SNS). Erste Entwicklungsschritte des SNSs sind in Abschnitt III.3 beschrieben. Das invaginierende Stomodaeum ist lateral von zwei longitudinalen Konnektiven begleitet, die gewissermaßen mit dem Stomodaeum „mitwachsen“ (Abb. 47, 52, 53). Die Hauptverbindung vom SNS zum ZNS findet sich ventromedial des Cheliceren- und Pedipalpanglions. Posteromedial des Chelicerenganglions befinden sich zwei globuläre Strukturen, die auch als „Stomatogastrische Ganglien“ bezeichnet werden (Abb. 47, 50, 51, 52, 53). Sie bilden sich aus Zellen der lateralen Wände des Stomodaeums (Scholl, 1977; siehe Abschnitt III.3). Aus diesen Stomatogastrischen Ganglien entspringen zahlreiche Nervenfasern und nehmen Kontakt mit den Konnektiven des ZNS auf, insbesondere in einem Bereich, der anterior des Chelicerenganglions beginnt und bis zum Pedipalpanglion reicht (Abb. 51, 52, 53). Neben der Innervierung der Chelicere ziehen einige Fasern direkt posterior zum Pedipalpanglion und einige anterior zur Protocerebralbrücke (Abb. 47, 52, 53); sie nehmen ebenfalls mit diesen beiden ZNS-Abschnitten Kontakt auf. Die beiden Stomatogastrischen Ganglien sind ihrerseits über eine praestomodaeal verlaufende Kommissur miteinander verbunden, die sogenannte

Stomodaealbrücke (Abb. 47, 52, 53; Hanström, 1928). Hier haben die Labralnerven ihren Ursprung.

III.4.2 *Lepisma saccharina*

III.4.2.1 Der circumoesophageale Neuropilring

Auch der circumoesophageale Neuropilring von *Lepisma saccharina* zeigt – mit einigen Abwandlungen aufgrund segmentaler Verschmelzungen und Reduktionen – den arthropodentypischen Aufbau (Abb. 54). Das Protocerebrum mit seiner distinkten Protocerebralbrücke ist der anteriorste Teil des Neuropilrings (Abb. 54). Es innerviert später den optischen Apparat. Da *Lepisma saccharina* jedoch reduzierte Lateralaugen hat, die lediglich aus 12 Ocellen bestehen, und die Medianaugen vollständig reduziert sind, ist das Protocerebrum nicht so ausgeprägt wie bei *Limulus polyphemus* und *Triops cancriformis*. Posterior des Protocerebrums folgt ungefähr in der Mitte des Neuropilrings das Deutocerebrum, das die Antenne innerviert (Abb. 54). Das Tritocerebrum gehört bei *Lepisma saccharina* zum anhangslosen Interkalarsegment. Das Tritocerebrum selbst ist nur in sehr frühen Embryonalstadien auszumachen, da es sich rasch mit dem anterior gelegenen Deutocerebrum vermennt (Abb. 54). Die Tritocerebralkommissur verläuft jedoch nach wie vor poststomodaeal und bildet die posteriore Grenze des circumoesophagealen Neuropilrings. Wiederum mit einigem Abstand folgt das Mandibelneuromer. Da über den Verlauf des Stomatogastrischen Nervensystems bei Hexapoden etliche Daten vorliegen, wurde *Lepisma saccharina* nicht gesondert diesbezüglich untersucht.

III.4.3 *Triops cancriformis*

III.4.3.1 Der circumoesophageale Neuropilring

Auch bei *Triops cancriformis* findet man den anterioren Gehirnabschnitt in einem charakteristischen Neuropilring organisiert, der das Stomodaeum umgibt (Abb. 55, 56, 57, 58). Den anteriorsten Teil bildet das Protocerebrum, welches den späteren optischen Apparat inklusive Lateralaugen und Medianaugen innerviert. Die zu diesem Gehirnabschnitt gehörende Kommissur ist die sehr ausgeprägte Protocerebralbrücke, die die anteriore Begrenzung des Neuropilrings darstellt (Abb. 56, 57, 58). Posterior des Protocerebrums folgt ungefähr in der Mitte des circumoesophagealen Neuropilrings das Deutocerebrum. Dieses innerviert die erste Antenne (Abb. 55, 56). Zwei Nervenstränge ziehen vom Deutocerebrum in die erste Antenne. Die deutocerebrale Kommissur verläuft zumindest zum größten Teil praestomodaeal und vermennt sich mit der prominenten Protocerebralbrücke. Lateral der Protocerebralbrücke finden wir eine prominente globuläre Struktur, die zum Protocerebrum gehört. Zwischen dem Protocerebrum und dem Deutocerebrum befindet sich eine globuläre Struktur, von der ausgehend ein dünnes

Axonbündel nach anterior in die Nähe der ersten Antenne verläuft (Abb. 56). Die segmentale Zugehörigkeit dieses Globulus ist unklar. Posterior des Deutocerebrums folgt das Tritocerebralganglion, von dem ausgehend die Innervierung der zweiten Antenne erfolgt (Abb. 55, 56, 57). Es konnte nicht festgestellt werden, ob diese 3-4 Faserstränge das Tritocerebrum separat verlassen oder Ergebnis einer ganglionnahen Verzweigung sind. Bei *Triops cancriformis* liegen deuto- und tritocerebrales Ganglion so dicht beieinander, daß sie fast zu verschmelzen scheinen (Abb. 55, 56, 58). Die Tritocerebralkommissur verläuft poststomodaeal und bildet die posteriore Grenze des circumoesophagealen Neuropilrings (Abb. 55, 56, 58). Posterior des Tritocerebrums folgt in einigem Abstand das Mandibelneuromer (Abb. 55, 57, 58). Die Mandibeln werden offenbar von drei Nervenfaserbündeln aus dem Mandibelganglion innerviert (Abb. 58).

III.4.3.2 Das Stomatogastrische Nervensystem

Das SNS von *Triops cancriformis* zeigt etliche Ähnlichkeiten zu dem von *Limulus polyphemus*. Zwei laterale stomatogastrische Konnektive begleiten das invaginierende Stomodaeum (Abb. 57, 58). Zwei Stomatogastrische Ganglien liegen medial des Tritocerebralganglions (Abb. 57, 58). Die beiden Stomatogastrischen Ganglien sind über eine Stomodaealbrücke miteinander verbunden, aus der ebenfalls die Labaralnerven entspringen (Abb. 57, 58; [=labrale Kommissur, Harzsch & Glötzner, 2002]). Die Hauptverbindung des Stomatogastrischen Nervensystems zum zentralnervösen Neuropilring verläuft von den Stomatogastrischen Ganglien zu den ihnen am nächsten gelegenen Ganglien der zweiten Antennen, den Tritocerebralganglien.

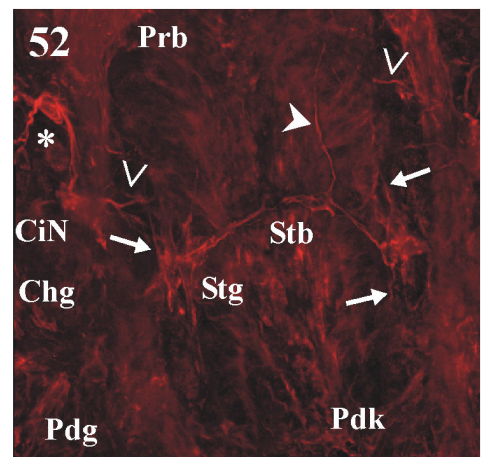
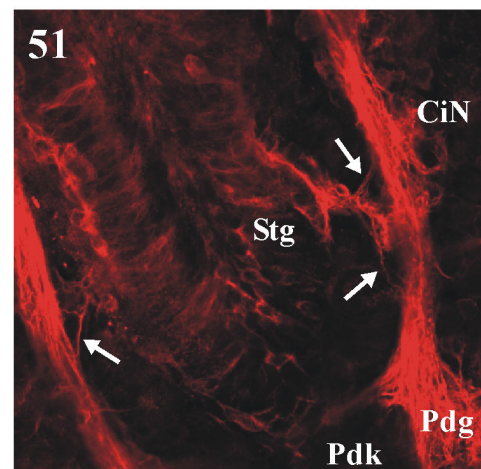
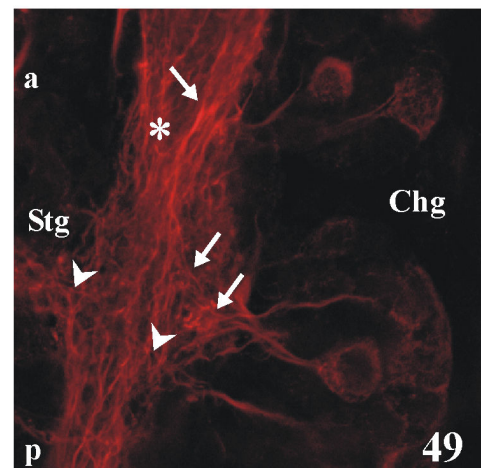
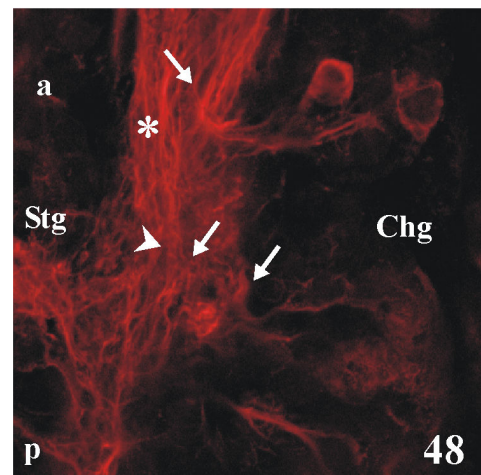
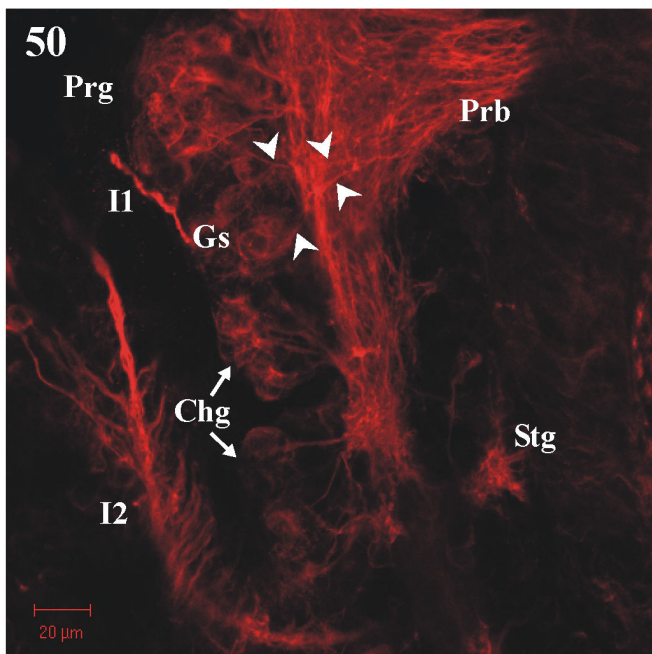
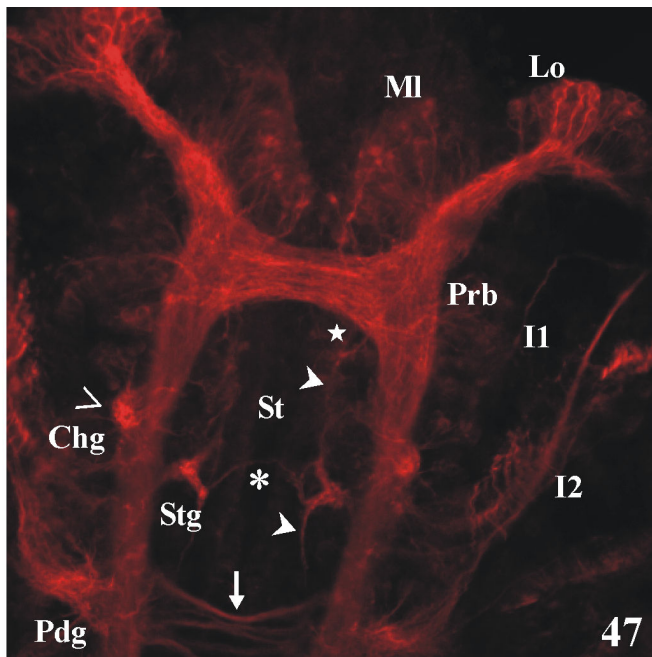


Abb. 47 *Limulus polyphemus*, circumoesophagealer Neuropilring (S5/S6, α -Tubulin). Der Neuropilring, der das Stomodaeum (St) umgibt, ist dreigeteilt. Anterior liegt das Protocerebrum mit der Protoce-rebralbrücke (Prb), den optischen Loben (Lo) und den Medianloben (MI). Die Kommissur des folgenden Chelicerenganglions (Chg) verläuft zum größten Teil praestomodaeal und vermischt sich mit der Protoce-rebralbrücke; nur wenige Fasern verlaufen poststomodaeal. Der Pfeil markiert die postorale Kommissur, die auch einige Fasern der Chelicerenkommissur enthält. Die Kommissur des Pedipalpenganglions (Pdg) bildet den posterioren Abschluß des Neuropilringes. Die offene Pfeilspitze deutet auf das die Chelicere innervierende Neuropil. Posteromedial des Chelicerenganglions liegen die Stomato-gastrischen Ganglien (Stg). Ihre Fasern führen in posteriore Rich-tung zum Pedipalpenganglion und in anteriore Richtung zur Protoce-rebralbrücke (Pfeilspitze). Seitlich des \star kontaktieren einige Fasern des SNS die Protoce-rebralbrücke. Die Stomodaealbrücke ist durch den Asterisk (*) markiert. I = Intestinalv. **Abb. 48** *Limulus poly-phemus*, Chelicerenganglion (α -Tubulin). Die Vergrößerung des Chelicerenganglions (Chg) zeigt die nach anterior verlaufenden Fas-ern (Pfeile), aus denen der praestomodaeal verlaufende Teil der Chelicerenkommissur besteht (nur ein kleiner Teil des Ganglions ist in der Focusebene). Das die Chelicere innervierende Neuropil \rightarrow

→ liegt unter dem (*). Die Verbindungen von Stomatogastrischem Ganglion (Stg) und Chelicerenganglion umfassen ein größeres Gebiet; Nervenfasern laufen nach anterior (a), lateral und posterior (p) (siehe auch Abb. 51).

Abb. 49 *Limulus polyphemus*, Chelicerenganglion (andere Focusebene, α -Tubulin). Einige der anterior verlaufenden Fasern des Chelicerenganglions (Chg) sind durch Pfeile gekennzeichnet. Das Stomatogastrische Ganglion ist mit dem ZNS über Fasern verbunden, die in anteriore (a), posteriore (p) und laterale (offene Pfeilspitzen) Richtung verlaufen.

Abb. 50 *Limulus polyphemus*, Glomeruli entlang des Neuropilrings (α -Tubulin). Lateral der Protocerebralbrücke befindet sich ein umfangreicher Glomerulus (Prg) aus zahlreichen Neuronen; ihre Axone münden in die Protocerebralbrücke (Prb). Posterior dieses protocerebralen Glomerulus liegt ein kleinerer Glomerulus (Gs), dessen segmentale Zugehörigkeit unklar ist. Auch dessen Fasern münden in die Protocerebralbrücke (Pfeilspitzen). Das darauffolgende Chelicerenganglion (Chg) ist in zwei Glomeruli unterteilt (Pfeile). Die Fasern der Neurone münden in den die Chelicere innervierenden Strang. I = Intestinalnerv; Stg = Stomatogastrisches Ganglion.

Abb. 51 *Limulus polyphemus*, Stomatogastrische Innervierung (α -Tubulin). Das Stomatogastrische Ganglion (Stg) nimmt in einem breiteren Areal um das Chelicerenganglion herum Kontakt mit dem ZNS auf (Pfeile). Die Hauptinnervierung findet sich zwischen dem die Chelicere innervierenden Neuropil (CiN) und dem Pedipalpenganglion (Pdg). Pdk = Pedipalpenkommissur.

Abb. 52 *Limulus polyphemus*, Ventralansicht des SNS (α -Tubulin). Die Stomatogastrischen Ganglien (Stg) sind deutlich zu erkennen. Sie sind über die Stomodaealbrücke (Stb) miteinander verbunden. Der Pfeil markiert die Fasern, die entlang des Stomodaeums verlaufen. Sie nehmen mit dem Pedipalpenganglion (Pdg) und der Protocerebralbrücke (Prb) Kontakt auf (außerhalb der Focusebene). Die Pfeilspitze deutet auf ein Faserbündel, das vermutlich der Ausgangspunkt der labralen Innervierung ist. Ein Nervenfaserbündel des Chelicerenganglions (Chg) innerviert die Chelicere (CiN, *), einige dünnere Faserbündel sind in Verbindung mit dem SNS (offene Pfeilspitzen). Pdk = Pedipalpenkommissur.

Abb. 53 *Limulus polyphemus*, Posteriorer Anteil des SNS (α -Tubulin). Zwei longitudinale Nervenfaserbündel des SNS verlaufen in posteriore Richtung und treten in das Pedipalpenganglion ein (Pdg, Pfeile). Der größte Anteil des Gehirns ist außerhalb der Focusebene. Das Neuropil und die Fasern, die die Chelicere innervieren (Pfeilspitzen), sind in dieser Ansicht zu erkennen. Chg = Chelicerenganglion; Pdk = Pedipalpenkommissur; Prb = Protocerebralbrücke; Stb = Stomodaealbrücke; Stg = Stomatogastrisches Ganglion.

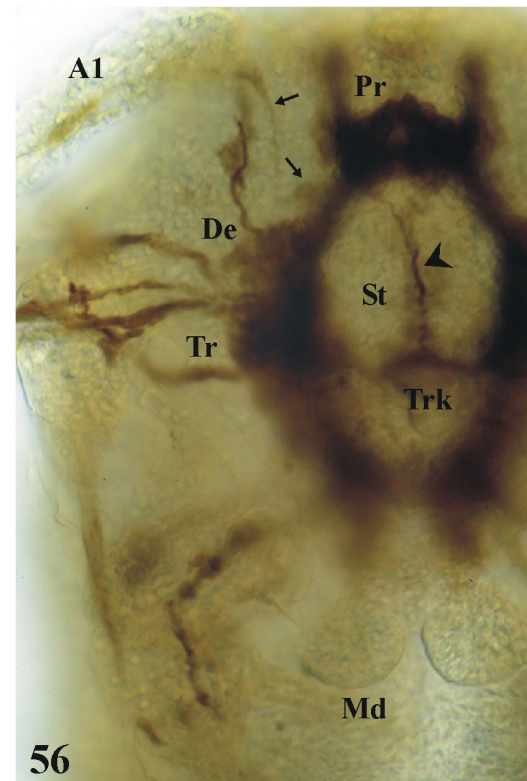
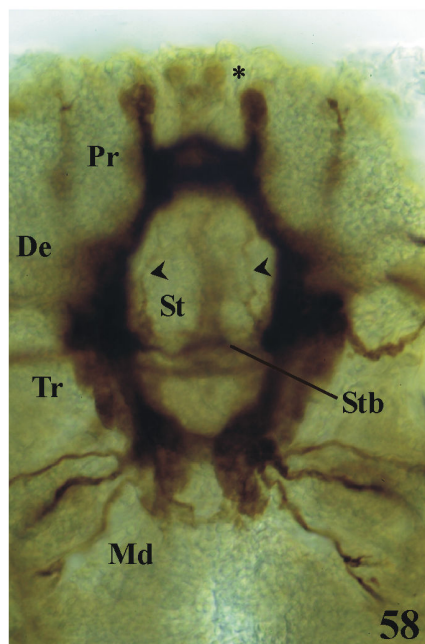
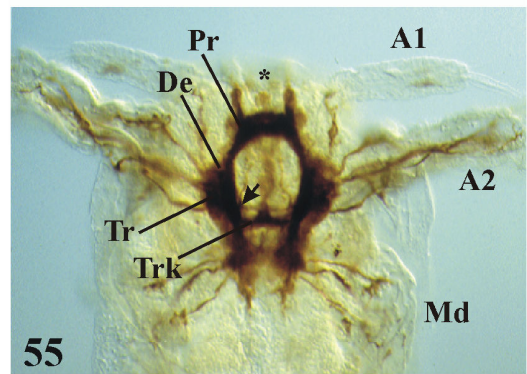
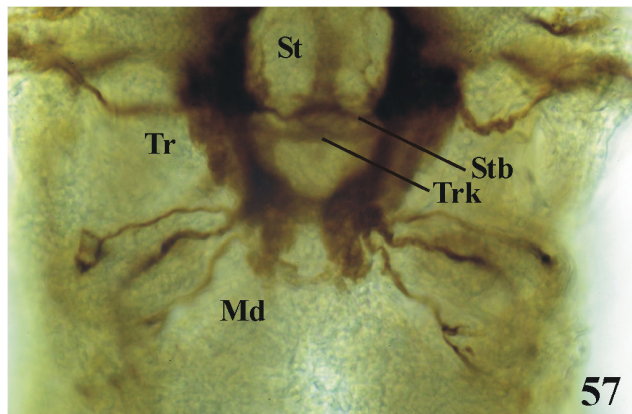
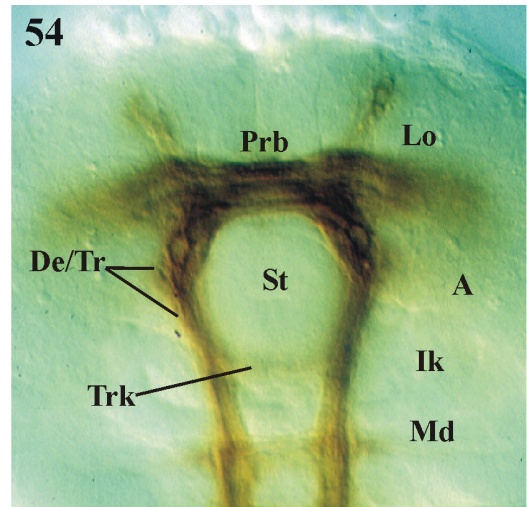
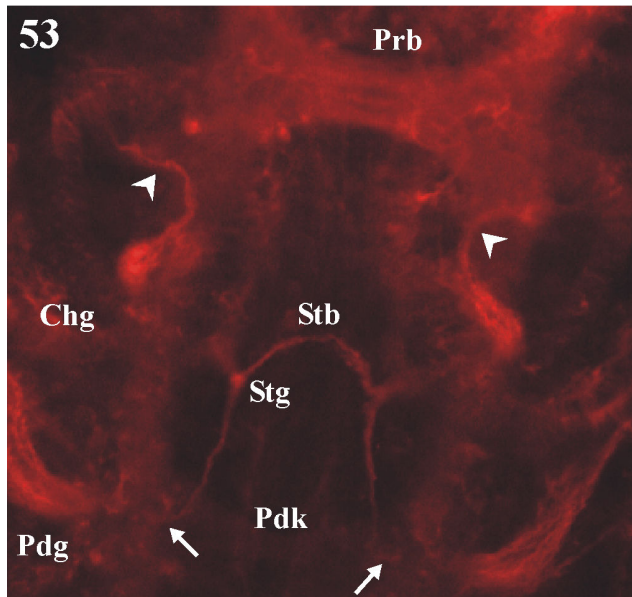
Abb. 54 *Lepisma saccharina*, Kopfinnervierung (Synorfl). Da beim Silberfischchen die Lateralaugen teilweise reduziert sind, ist der Lobus opticus nicht so ausgeprägt wie bei *Limulus polyphemus* oder bei *Triops cancriformis*. Das Interkalarsegment (Ik) wird im weiteren Entwicklungsverlauf reduziert, das dazugehörige Tritocerebrum (Tr) vermischt sich mit dem anterior gelegenen Deutocerebrum (De), das die Antennen (A) innerviert. Vom Tritocerebrum ist nur die poststomodaeal verlaufende Tritocerebralkommissur (Trk) deutlich zu erkennen. Md = Mandibelsegment; St = Stomodaeum.

Abb. 55 *Triops cancriformis*, Kopfinnervierung (Synorfl). Der „typische“ dreigeteilte Neuropilring der Arthropoden besteht aus dem Protocerebrum (Pr), das den Lobus opticus und bei Crustaceen das Naupliusauge innerviert. Darauf folgt das Deutocerebrum (De), welches die ersten Antennen (A1) innerviert, danach das Tritocerebrum (Tr), das die zweiten Antennen (A2) innerviert. Bei *Triops cancriformis* liegen Deuto- und Tritocerebrum äußerst dicht zusammen (siehe auch Abb. 56). Die Tritocerebralkommissur (Trk) bildet die posteriore Grenze des Neuropilrings. Das Stomatogastrische Nervensystem ist ähnlich strukturiert wie bei *Limulus polyphemus*, nur kontaktieren die Stomatogastrischen Ganglien das Tritocerebrum (Pfeil, Abb. 58). Md = Mandibel.

Abb. 56 *Triops cancriformis*, Antenneninnervierung (Synorfl). Das Deutocerebrum (De) und das Tritocerebrum (Tr) liegen so nahe zusammen, daß sie fast zu verschmelzen scheinen. Zwischen dem Protocerebrum (Pr) und dem Deutocerebrum liegt eine kleine glomeruläre Struktur, deren Fasern ebenfalls in die erste Antenne zu münden scheinen (Pfeile). Die Pfeilspitze deutet auf einen Nerv, der zum SNS gehört und vermutlich der Ausgangspunkt für die labrale Innervierung ist. Md = Mandibel; St = Stomodaeum; Trk = Tritocerebralkommissur.

Abb. 57 *Triops cancriformis*, Mandibelininnervierung (Synorfl). Posterior des Tritocerebrums (Tr) folgt das Mandibelneuromer. Die Mandibeln (Md) werden von drei Faserbündeln aus dem Mandibelanglion innerviert. St = Stomodaeum; Stb = Stomodaealbrücke.

Abb. 58 *Triops cancriformis*, Stomatogastrische Innervierung (Synorfl). Das SNS von *Triops cancriformis* ist ähnlich aufgebaut wie bei *Limulus polyphemus*. Zwei longitudinale Faserbündel begleiten das Stomodaeum (St, Pfeilspitzen). Die beiden Stomatogastrischen Ganglien sind über die Stomodaealbrücke (Stb) miteinander verbunden; hier entspringt die labrale Innervierung (außerhalb der Focusebene). Allerdings verläuft die Hauptverbindung des SNS mit dem ZNS über die am nächsten gelegenen Tritocerebralganglien (Tr). De = Deutocerebrum; Md = Mandibel; Pr = Protocerebrum; (*) markiert das Naupliusauge.



III.5 DAS RÄUMLICHE UND ZEITLICHE EXPRESSIONSMUSTER DES HOMÖOBOXGENS *DISTAL-LESS*

Das Expressionsmuster des Homöoboxgens *Distal-less* (*Dll*) wird sowohl für *Limulus polyphemus* als auch für *Lepisma saccharina* im Hinblick auf verschiedene Aspekte dargestellt. Einerseits hinsichtlich seiner frühen Funktionen, die teils prämorphogenetischer Natur als auch extremitätenspezifisch sind. Für *Limulus polyphemus* liegen einige wenige Daten vor (Mittmann & Scholtz, 2001), eine Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster über einen umfassenden Entwicklungszeitraum fehlt. Von *Lepisma saccharina* sind bereits Daten über die frühen Expressionsmuster bekannt (Scholtz *et al.*, 1998; Mittmann & Scholtz, 1998; Mittmann, 1998, 2000). Späte Stadien wurden bislang nicht berücksichtigt.

Der zweite Aspekt, unter dem das *Dll*-Expressionsmuster in beiden genannten Organismen studiert werden soll, ist die Beteiligung des Gens an der Neurogenese. Dies ist eine bislang bei weitem weniger berücksichtigte Rolle von *Dll*, obwohl sie bei fast allen bisher untersuchten Organismen festgestellt wurde (u. a. Panganiban *et al.*, 1997; Cohen & Jürgens, 1989a; Zusammenfassung Panganiban, 2000; Mittmann & Scholtz, 2001; Williams *et al.*, 2001). Mittmann & Scholtz (2001) finden über den Vergleich von Genexpressionsmustern und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen bei Xiphosuren und apterygoten Insekten eine Korrelation von *Dll*-Expressionen und der Differenzierung von Mechanorezeptoren, Chemorezeptoren und dem ZNS. Diese Daten werden im folgenden vorgestellt und ergänzt. Panganiban & Rubinstein (2002) konnten bei *Drosophila melanogaster* über Doppelmarkierungen mit Anti-*Dll*-Antikörper und dem gliazellspezifischen Anti-*repo*-Antikörper (=Anti-*RK2*) in einigen Gehirnbereichen eine Korrelation mit Gliazellen feststellen. Um nun die neurogenetische Expression von *Dll* darzustellen und eingehender zu studieren, wurden einerseits verschiedene Entwicklungsstadien von *Limulus polyphemus* und *Lepisma saccharina* hinsichtlich des Expressionsmusters von *Dll* untersucht. Darüber hinaus wurden Doppelmarkierungen mit Anti-*Dll*-Antikörper und Synorfl (Anti-*Drosophila*-synapsin) vorgenommen.

III.5.1 *Limulus polyphemus*

III.5.1.1 Das Expressionsmuster von *Distal-less*

Das früheste Stadium, das hinsichtlich seiner *Dll*-Expression untersucht wurde, ist jünger als das S0-Stadium (siehe Abschnitt III.1). Es besteht aus einem ovalen Keimstreif und zeigt keinerlei Ansätze von Extremitätenknospen. Dennoch finden wir in mehreren aufeinanderfolgenden Segmenten eine prämorphogenetische Expression (Abb. 59).

Im S0-Stadium sowie im S1-Stadium exprimieren alle prosomalen Extremitätenknospen das Gen (Abb. 60). Eine labrale Expression konnte in beiden Stadien nicht entdeckt werden.

Im S2-Stadium finden wir die distalen *Dll*-Expressionen in den sich vergrößernden Extremitätenknospen (Abb. 61). Lateral jeder prosomalen Extremitätenknospe (mit Ausnahme der Chelicere) exprimiert ein kleines, rundes Zellcluster *Dll* (Abb. 61). Diese laterale Expression ist mit Ausnahme des vierten Laufbeinpaars nur transient vorhanden und verschwindet am Ende des darauffolgenden S3-Stadiums wieder. Nur aus dem weiterhin *Dll*-positiven Zellcluster des vierten Laufbeinpaars wächst die ebenfalls *Dll* exprimierende Flabellumknospe aus. Im Labrum ist noch keine *Dll*-Expression zu finden. Auch die opisthosomalen Segmente zeigen keine *Dll*-Expression. Zwischen den prosomalen Anhangspaaren sowie im Kopflappen findet man in regelmäßigen Abständen dunkle Bereiche, die auf den ersten Blick wie *Dll*-positive Zellen aussehen. Bei genauerer Betrachtung läßt sich in diesem Stadium - mit Ausnahme einiger anteriorer Zellen im Kopflappen - keine zelluläre *Dll*-Expression nachweisen. Es scheint sich bei den dunklen Bereichen eher um kleine Gruben zu handeln. Vermutlich sind diese dunklen Bereiche auf die neurogenetischen Immigrationszentren zurückzuführen. Sie stimmen mit diesen einerseits hinsichtlich der Lage überein, verschwinden andererseits in einem Stadium, in dem die Axogenese so weit abgeschlossen ist, daß die Immigrationszentren nicht mehr oder nur noch als sehr dünne Nervenfortsatzbündel vorhanden sind (siehe Diskussion).

Im S3-Stadium (Abb. 62) werden alle für das S2-Stadium erwähnten Expressionen beibehalten. Weiterhin exprimieren einige Zellen am anterioren Rand des Kopflappens *Dll*. Auch das Labrum zeigt eine distinkte Expression.

Am Opisthosoma zeigt der anteriore Anhang eine schwach ausgeprägte *Dll*-Expression in Form eines Streifens; beim posterioren Anhang scheinen einige Zellen mit einer *Dll*-Expression zu beginnen. Eine prämorphogenetische Expression konnte in beiden Opisthosomalanhängen nicht festgestellt werden.

Im S4-Stadium zeigen die distalen Enden der prosomalen Anhänge und des Labrums eine distinkte *Dll*-Expression (Abb. 63). Die auswachsende Flabellumknospe lateral des vierten Laufbeinpaars ist *Dll*-positiv, während die *Dll*-Expressionen in den lateralen Zellclustern der restlichen Prosomaanhänge verschwunden sind. Im Kopflappen zeigen beide Loben des sich entwickelnden Gehirns *Dll*-Expressionen, insbesondere in Zellen des anterioren Bereichs.

Am Opisthosoma finden wir keinerlei Expression im Chilaria-Segment. Die länglichen Knospen des zweiten und dritten Anhangspaars (Genitaloperculum und erstes Buchkiemen tragendes Blattbeinpaar) exprimieren das Gen in einem distalen Streifen. Im darauffolgenden Blattbeinpaar finden wir eine beginnende *Dll*-Expression in der länglichen Knospe. Im medioposterioren Bereich, wo sich das Proktodaeum bildet und später der Schwanzstachel entsteht, wird ebenfalls *Dll* exprimiert.

Im S5-Stadium finden wir nach wie vor die distale *Dll*-Expression in den Prosomaanhängen und dem Labrum. Darüber hinaus exprimiert ein Zellcluster in den Coxen sowie im Trochanter aller prosomaler Extremitäten mit Ausnahme der Cheliceren *Dll* (Abb. 64).

Im Kopflappen zeigen größere Zellgruppen der beiden Gehirnloben eine distinkte *Dll*-Expression. Auch in den restlichen Prosomasegmenten findet man in der Medianen kleine, paarige Gruppen aus 5-6 Zellen, die *Dll* exprimieren. Sie liegen im Bereich des sich entwickelnden Strickleiternnervensystems respektive des jeweiligen Ganglions. Ihre Anzahl nimmt im Verlauf der Entwicklung zu (späteres Stadium siehe Abb. 67).

Am Opisthosoma zeigt sich nach wie vor keine Expression in den Chilariaknospen. Das zukünftige Genitaloperculum und das darauf folgende Blattbeinpaar (3. Opisthosomalanhang) sind im distalen Bereich über die gesamte Länge der Knospe *Dll*-positiv. In beiden Knospen zeigt ein median gelegenes Zellcluster eine stärkere *Dll*-Expression; hier wachsen im Verlauf der weiteren Entwicklung zwei Knospen aus. Eine Hoechstfärbung zeigt zahlreiche Mitosen in diesem Bereich. Die dünnen Expressionsstreifen im 4. Opisthosomalsegment sind weiterhin vorhanden, ebenso die Expression im posteriorsten Ende.

Entlang des gesamten Prosomarandes bilden sich kleine *Dll*-positive Zellcluster. Am Opisthosomarand exprimieren kleine Zellgruppchen im Bereich der zukünftigen Lateraldornen *Dll*.

Nach wie vor exprimieren im S6-Stadium die prosomalen Extremitäten, das Labrum und die Flabellumknospe im distalen Bereich *Dll* (Abb. 65). Die *Dll*-positiven coxalen Zellcluster in Pedipalpen und Laufbeinen dehnen sich aus. Das *Dll*-positive Zellcluster im distalen Trochanterbereich der genannten Anhänge ist nach wie vor vorhanden.

Im ZNS exprimieren die Zellcluster in beiden Gehirnloben (Abb. 66) sowie die segmentalen Zellgruppen entlang der prosomalen Strickleiter (Abb. 67) das Gen.

Die mittlerweile zu Knospen ausgebildeten Chilaria sind nach wie vor *Dll*-negativ. Genitaloperculum und erstes Buchkiemen tragendes Blattbeinpaar haben neben der über die gesamte Knospe reichenden distalen *Dll*-Expression je einen paarigen, medianen Fortsatz ausgebildet, der ebenfalls *Dll* exprimiert. Diese Fortsätze sind im ersten Buchkiemen tragenden Blattbeinpaar größer als im Genitaloperculum. Die Knospen der zwei darauffolgenden Blattbeinpaare zeigen weiterhin einen länglichen, distalen Expressionsstreifen (Abb. 65). Die posteriore Spitze exprimiert ebenfalls *Dll*.

Die *Dll*-positiven Zellen, die das gesamte Prosoma umgeben, organisieren sich zu deutlichen Zellclustern (Abb. 65, 68). Am Opisthosomarand zeigen auf beiden Seiten sechs Zellcluster eine distinkte Expression. Diese opisthosomalen Randcluster sind größer als die prosomalen.

In den prosomalen Extremitäten vergrößern sich die *Dll*-positiven Zellcluster in Coxa und Trochanter. Am distalen Ende der Tibia des vierten Laufbeinpaares beginnen vier halbkreisförmig angeordnete Zellcluster mit einer ausgeprägten *Dll*-Expression (Abb. 65, 70). Aus diesen Clustern entstammen die vier „Skistock“-Fortsätze. Dorsal der *Dll*-positiven Zellcluster, die das Prosoma umranden, beginnt eine weitere Reihe kleinerer, regelmäßiger Zellgruppen mit einer *Dll*-Expression (Abb. 65, 68). Neben etlichen *Dll*-positiven Einzelzellen auf der Dorsalseite des Prosomas finden sich sechs große *Dll* exprimierende Zellcluster, in jeder longitudinalen Hälfte drei in spiegelbildlichen Positionen.

Im letzten auf seine *Dll*-Expression hin untersuchten S7-Stadium bleiben die distalen Extremitätenexpressionen in den prosomalen und opisthosomalen Anhängen bestehen und werden weiter differenziert. Die Prosomaanhänge zeigen im distalen Bereich bis zur Tibia (Patella) eine *Dll*-Aktivität, in den Cheliceren die distalen zwei Segmente. Die *Dll*-positiven Zellcluster in Coxa und Trochanter der Prosomaanhänge vergrößern sich weiter, insbesondere in der Coxa (Abb. 69). Sie scheinen sich in Grüppchen zu organisieren. Auch die Zellen im Trochanter bilden eine große und ein oder zwei kleinere Formationen. Nur die Coxen des vierten Laufbeinpaars zeigen eine kleinere *Dll*-positive Zellgruppe. Die vier tibialen „Skistock“-Fortsätze sind ausgewachsen und exprimieren *Dll*. Im Innern der Laufbeine begleiten einige *Dll*-positive Zellen den zentralen Nervenstrang (Abb. 69).

Im Gehirn zeigen einige Zellen im Lobus opticus und zahlreiche Einzelzellen im medianen Lobus eine *Dll*-Expression. Die *Dll*-positiven Zellen pro segmentaler ZNS-Anlage des Prosomas bleiben bestehen. Auch im Chilariaganglion findet sich diese *Dll*-Expression in einigen Zellen, wobei die ausgewachsenen Knospen selber nach wie vor *Dll*-negativ sind.

Neben den Expressionen am distalen Rand und im medianen Fortsatz des Genitaloperculum und des darauffolgenden Blattbeinpaars exprimieren auch einzelne Zellen auf der ovalen Oberfläche der Blattbeine *Dll* (Abb. 70). Die medianen Fortsätze des Genitaloperculum bilden sich langsam – bei weiterhin bestehender Expression – zurück (Abb. 70). Die mittlerweile deutlich auswachsenden Lateralornen zeigen eine distinkte *Dll*-Expression.

Die großen *Dll*-exprimierenden Zellcluster im Prosomarang bestehen aus 8-12 Zellen, die kleineren aus 4-5 Zellen (Abb. 68).

III.5.1.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Zahlreiche der im vorherigen Abschnitt aufgeführten *Dll*-Expressionsmuster können nicht mit einer extremitätenspezifischen Funktion des Gens in Einklang gebracht werden. Das betrifft beispielsweise die Expressionen in den das Prosoma umgebenden Zellclustern oder in den Lateralornen oder auch im Gehirn und im ZNS. Diese Expressionsmuster sind erklärungsbedürftig. Um in einem ersten Schritt zu überprüfen, was denn aus den betreffenden embryonalen Bereichen im weiteren Entwicklungsverlauf respektive bei Schlupf des ersten Larvenstadiums entsteht, wurden Trilobitenstadien und Larven nach der ersten postembryonalen Häutung mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Auch wenn auf diesem Weg nicht das genaue Zellschicksal einer spezifischen Zelle verfolgt werden kann, ergeben sich doch deutliche räumliche Korrelationen zwischen der Position der fraglichen *Dll*-positiven Zellen der Embryonalstadien und verschiedenen Sinnesorganen, insbesondere Mechanorezeptoren.

Die Dorsalseite des gesamten Prosomas ist mit einzeln stehenden kleinen Borsten bedeckt (Abb. 71). Entlang der Prosomakante finden wir zwei Reihen unterschiedlicher Mechanorezeptoren, die in regelmäßigen Abständen angeordnet sind. Auf der Dorsalseite der Kante ist dies eine Reihe von gelenkig mit der Cuticula verbundenen Borsten (Abb. 72, 73); nur ein schmaler Bereich am anteriorsten Ende ist bis auf vier längere Borsten borstenfrei. Auf der Ventralseite der prosomalen Kante sitzen sogenannte „peg sensilla“

(Fahrenbach, 1999), von den Entdeckern auch „spine-like mechanoreceptors“ genannt (Kaplan *et al.*, 1976). Da bislang kein deutscher Name existiert, die passendste Bezeichnung „Zapfen“ jedoch bereits für optische Rezeptoren vergeben ist, werde ich diese Sinnesorgane im folgenden aufgrund ihrer Form als „Conus-Sensillen“ bezeichnen (Abb. 73, 74).

Die Conus-Sensillen sind in der Cuticula in einer flachen Grube versenkt, überragen jedoch meist den Rand. In der Mitte der Grube befindet sich ein Hügel aus beweglicher Cuticula; die starre Grubencuticula geht nahtlos in die bewegliche Hügelcuticula über. Auf der Spitze des flexiblen Hügels sitzt der namensgebende Conus, ebenfalls aus weicherer Cuticula als der restliche Prosomaschild (Abb. 74). Im Inneren dieses Mechanorezeptors, der sich unterhalb der Oberfläche durch die gesamte Chitinschicht zieht, befindet sich eine Art Haar, das an seiner Basis von 8-10 Dendriten ringförmig umgeben ist (Kaplan *et al.*, 1976). Conus-Sensillen sind die bei *Limulus polyphemus* am häufigsten vorkommenden Mechanorezeptoren, die in unterschiedlicher Dichte über die gesamte Oberfläche der Tiere verteilt sind, insbesondere um die Lateralaugen und an Kanten, Furchen, Dornen und Fortsätzen (Kaplan *et al.*, 1976; Fahrenbach, 1999). Conus-Sensillen können erheblich in der Größe variieren.

Die REM-Untersuchung der Coxa der prosomalen Anhänge von der Pedipalpe bis zum 4. Laufbein ergab wiederum eine Korrelation mit verschiedenen Sinnesrezeptoren. Der mediobasale Anteil der Coxa wird auch Gnathobasis genannt, da bei *Limulus* die Mundöffnung genau zwischen den prosomalen Extremitäten liegt (Abb. 75). Die Gnathobasen, also die Bereiche mit den spätembryonalen *Dll*-Expressionen, sind mit zahlreichen beweglichen Dornen (Abb. 75) und Chemorezeptoren (Barber, 1956; Hayes & Barber, 1967) ausgestattet. Einer der drei die Extremitäten innervierenden Nervenstränge (siehe III.3) verzweigt sich rasch mehrfach und innerviert die Gnathobasis. Nur die Gnathobasis des vierten Laufbeinpaars ist als Teil des posterioren Mundabschlusses mit weniger Dornen besetzt. Dies ist ebenfalls eine Korrelation zu der geringeren *Dll*-Expression. Im Trilobitenstadium ist die Bedornung der Gnathobasen nicht so umfangreich wie in allen späteren Stadien, vermutlich weil die kleinen Pfeilschwanzkrebse erst nach der ersten postembryonalen Häutung mit der Nahrungsaufnahme beginnen.

Auch im Trochanter der entsprechenden prosomalen Extremitäten finden sich in den Hauptbereichen der embryonalen *Dll*-Expression Rezeptoren in Form von beweglichen Dornen.

Die sechs Lateraldornen am Opisthosomarand (Abb. 76) sind ebenfalls Mechanorezeptoren, von denen jeder zusätzlich ungefähr 300 Conus-Sensillen beherbergt (Fahrenbach, 1999); aus diesem Grund weisen sie eine ausgeprägte Innervierung auf.

Eine REM-Aufnahme des Genitaloperculums oder auch der ersten Buchkiemen tragenden Blattbeine zeigt, daß die gesamte halbkreisförmige Kante dicht mit Borsten besetzt ist (Abb. 77, 78; siehe auch III.3). Einzelne dünne Börstchen bedecken auch die ovale Oberfläche des Genitaloperculums.

Eine REM-Untersuchung des Flabellums ergibt, daß es insbesondere in der distalen Hälfte mit kurzen Borsten oder Dornen besetzt ist, die in cuticulare Gruben eingesenkt sind. Es wurde nicht weiter untersucht, um welche Art von Sinnesorganen es sich hierbei handelt.

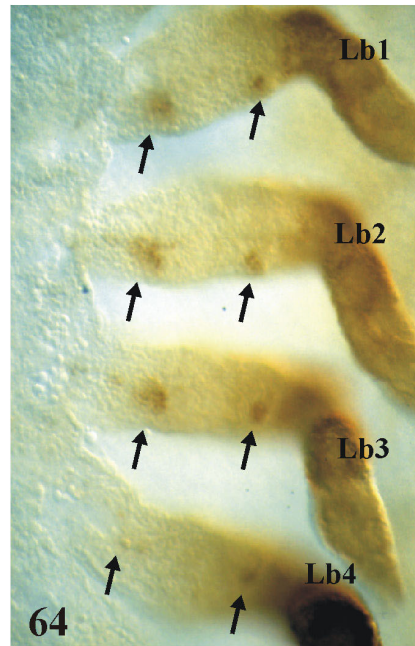
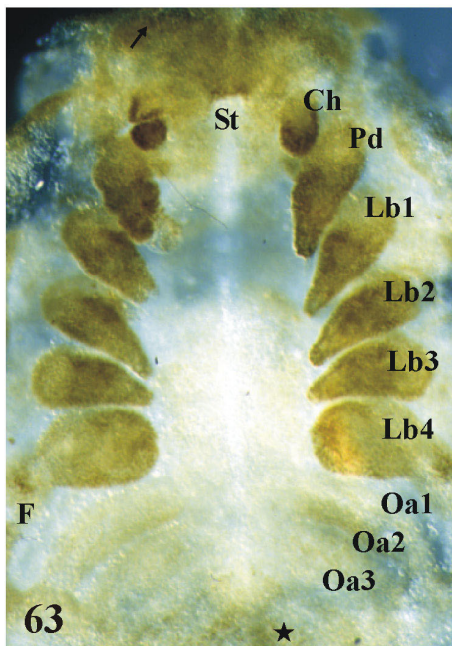
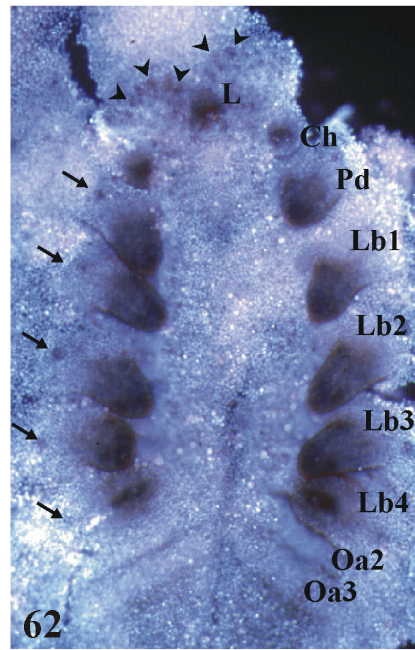
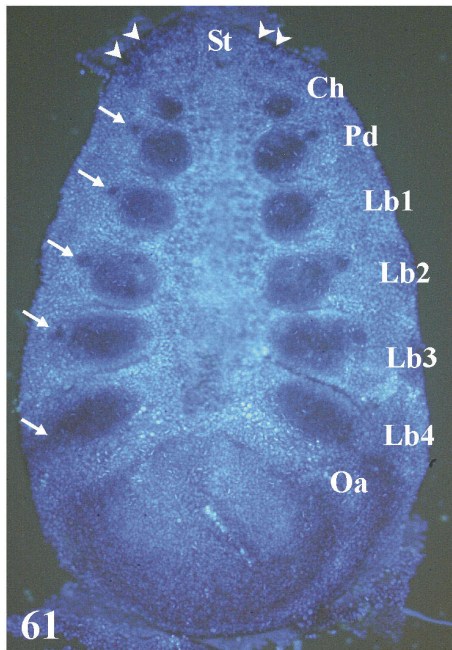
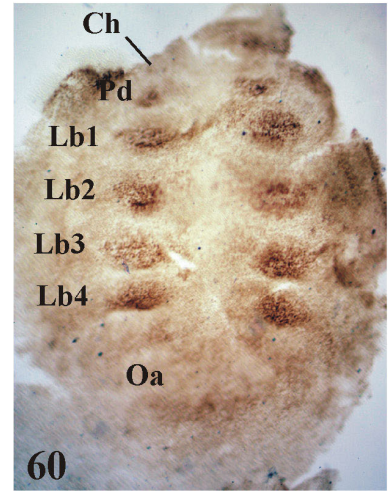
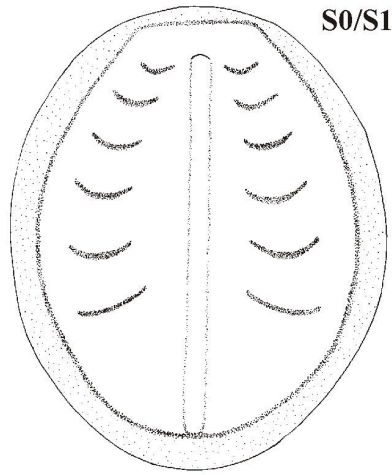
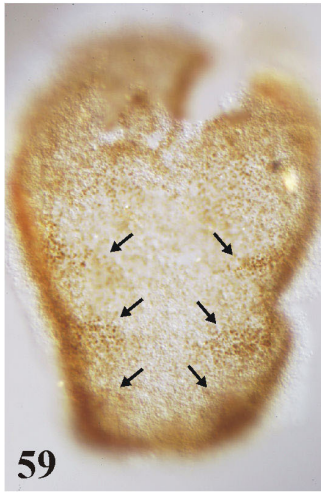


Abb. 59 *Limulus polyphemus*, S00-Stadium (*Dll*). Im jüngsten untersuchten Stadium finden wir eine prämorphogenetische Expression in segmental angeordneten Zellclustern (Pfeile). Die Extremitätenknospen haben noch nicht mit dem Auswachsen begonnen. Abb. 60 *Limulus polyphemus*, S0/S1-Stadium (*Dll*). Aus dem Bereichen prämorphogenetischer Expression wachsen die ebenfalls *Dll*-positiven prosomalen Extremitätenknospen aus. Wegen der Biegung des Embryos ist die Chelicerenknospe (Ch) außerhalb der Focusebene. Am Opisthosoma (Oa) ist noch keine Expression zu sehen. Lb = Laufbein; Pd = Pedipalpe. Abb. 61 *Limulus polyphemus*, S2-Stadium (*Dll*). Die Knospen aller prosomalen Extremitäten zeigen eine *Dll*-Expression, im Labrum sowie im Opisthosoma (Oa) ist noch keine Expression zu finden. Lateral jedes prosomalen Anhangs mit Ausnahme der Cheliceren (Ch) ist ein *Dll*-positives Zellcluster (Pfeile). Aus diesem Zellcluster wächst seitlich des 4. Laufbeines (Lb4, außerhalb der Focusebene) das Flabellum aus, in allen anderen Segmenten verschwindet die Expression am Ende des nächsten Stadiums wieder. Zwischen den prosomalen Extremitäten und im Kopflappen finden sich in regelmäßigen Abständen dunkle Spots, die *Dll*-positiven Zellen ähneln. Es scheint sich hierbei jedoch um die Spots der neurogenetischen Immigrationszentren zu handeln. →

➔ Einige Zellen im Kopflappen zeigen jedoch eine deutliche *Dll*-Expression (Pfeilspitzen). Pd = Pedipalpe; St = Stomodaeum.

Abb. 62 *Limulus polyphemus*, S3-Stadium (*Dll*). Die Knospen der prosomalen Extremitäten zeigen eine distinkte *Dll*-Expression; die Spots lateral der Extremitäten (Pfeile) sind nach wie vor vorhanden. Auch im Labrum (L) anterior des Stomodaeums ist eine ausgeprägte Expression zu finden. Im Opisthosoma (Oa) scheint im zukünftigen Segment des Genitaloperkulum ein Streifen *Dll*-positiver Zellen vorzuliegen, auch im darauffolgenden ersten Buchkiemen tragenden Blattbeinpaar scheinen einzelne Zellen das Gen zu exprimieren. Im sich entwickelnden Gehirn liegen deutliche Expressionen vor (Pfeilspitzen). Die dunklen Spots zwischen den prosomalen Extremitäten, die auf die Immigrationszentren zurückgehen, sind weiterhin vorhanden. Ch = Chelicere; Pd = Pedipalpe.

Abb. 63 *Limulus polyphemus*, S4-Stadium (*Dll*). Nach wie vor sind alle distalen Anteile der prosomalen Extremitäten sowie das Labrum *Dll*-positiv. Das auswachsende Flabellum (F) zeigt eine deutliche Expression, während die *Dll*-positiven Spots lateral der restlichen Laufbeine (Lb) sowie der Pedipalpen (Pd) wieder verschwunden sind. Im Kopflappen zeigen etliche Zellen eine *Dll*-Expression (Pfeil). Am Opisthosoma finden wir keine Expression im Segment der Chilaria (Oa1), hingegen distale Streifen mit *Dll*-positiven Zellen in den beiden darauffolgenden Segmenten. Im posteriorsten Abschnitt, in dem später der Schwanzstachel entsteht (★, außerhalb der Focusebene), beginnen einige Zellen ebenfalls mit der *Dll*-Expression.

Abb. 64 *Limulus polyphemus*, Extremitätenexpression, S5-Stadium (*Dll*). Neben der distalen *Dll*-Expression finden wir in den Laufbeinen (Lb) auch *Dll*-positive Zellcluster in den Coxen sowie im Trochanter (Pfeile). Beachte, daß diese proximalen Expressionen im 4. Laufbein schwächer sind als in den restlichen Laufbeinen.

Abb. 65 *Limulus polyphemus*, Gesamtansicht, S6-Stadium (*Dll*). Die distalen Anteile aller prosomaler Anhänge exprimieren *Dll*. Auch die Kanten und medianen Fortsätze der opisthosomalen Blattbeine (Oa2, Oa3) zeigen eine *Dll*-Expression, wohingegen die Chilaria (Chi = Oa1) das Gen nicht exprimieren. Das Flabellum (F) zeigt eine distinkte Expression. Das gesamte Prosoma ist umgeben von zwei Reihen *Dll*-positiver Zellclustern (Pfeile, Pfeilspitzen), die unterschiedlich viele Zellen enthalten (siehe auch Abb. 68). Auf jeder Seite des Opisthosomas sind sechs *Dll*-positive Zellcluster (offene Pfeilspitzen); hier entstehen später die Lateralornen. Auch der Bereich des späteren Schwanzstachels zeigt eine *Dll*-Expression (Stern). Die *Dll*-positiven Zellgruppen auf der Dorsalseite des Prosomas sind mit ★ markiert. Ch = Chelicere; Pd = Pedipalpe; Lb = Laufbein; St = Stomodaeum.

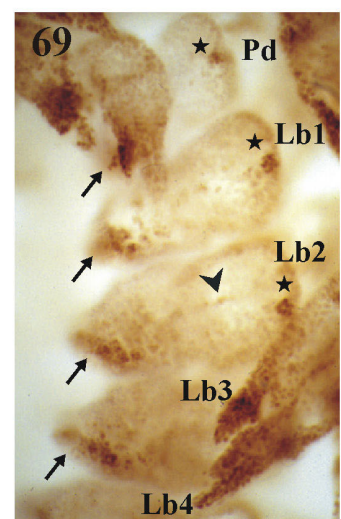
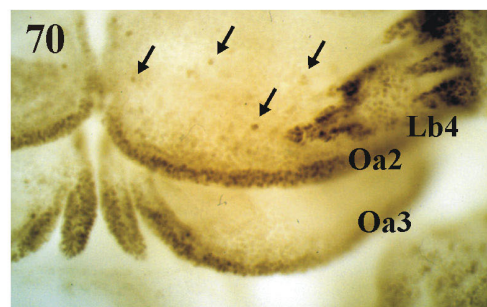
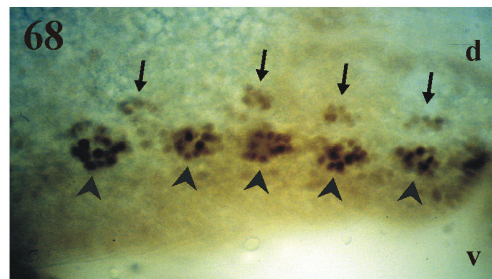
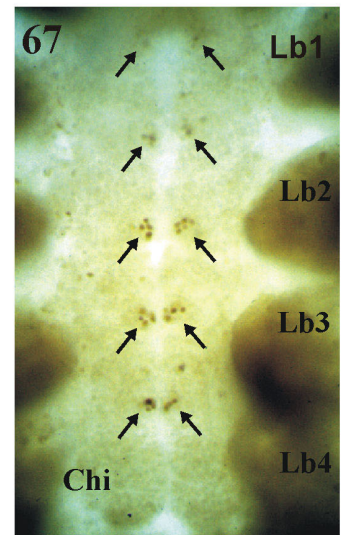
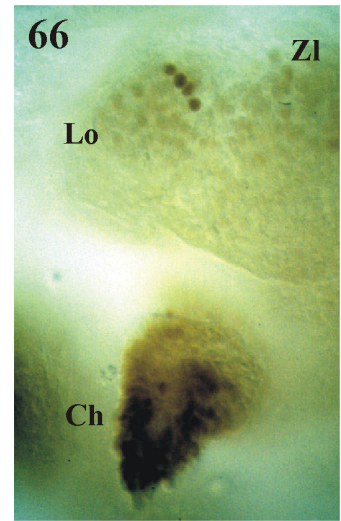
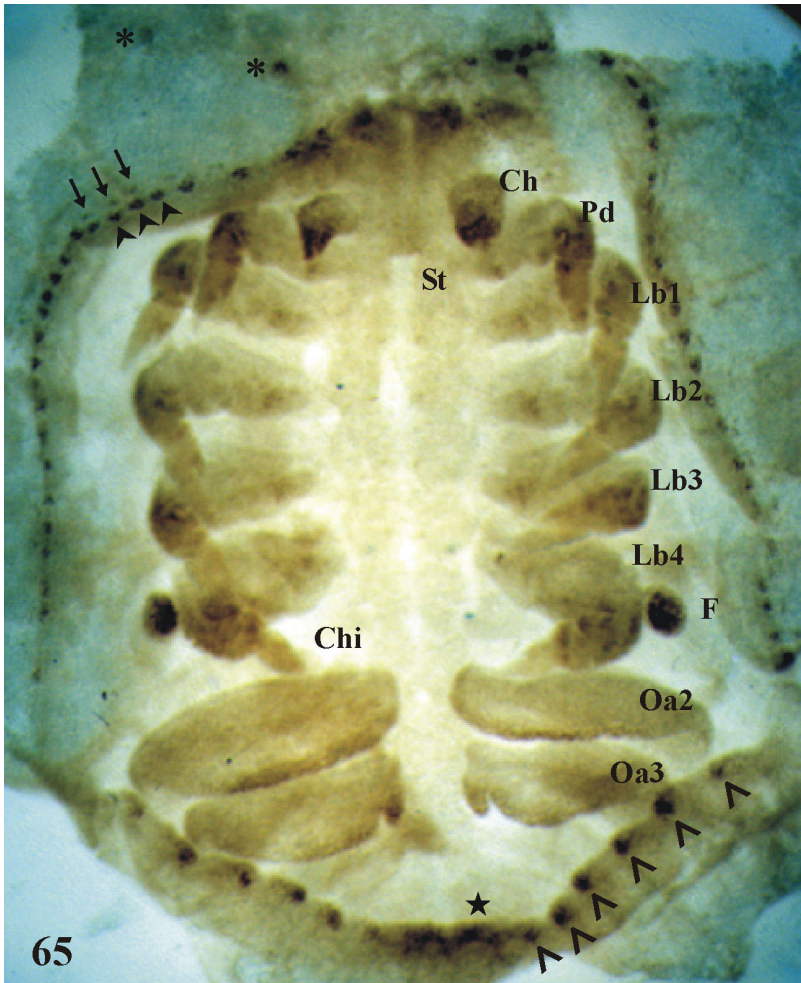
Abb. 66 *Limulus polyphemus*, Gehirn, S6-Stadium (*Dll*). Im sich entwickelnden Gehirn exprimieren einige Zellen im Lobus opticus (Lo) sowie im benachbarten Zentrallobus (Zl) *Dll*. Ch = Chelicere.

Abb. 67 *Limulus polyphemus*, ZNS/Ganglien, S6-Stadium (*Dll*). Einige Zellen in oder an den sich entwickelnden Ganglien zeigen eine deutliche *Dll*-Expression (Pfeile). Chi = Chilaria; Lb = Laufbein.

Abb. 68 *Limulus polyphemus*, Ausschnitt Prosomarang, S6-Stadium (*Dll*). Die größeren *Dll*-positiven Zellcluster auf der ventralen (v) Seite bestehen aus ca. 8-12 Zellen (Pfeilspitze), die kleineren auf der dorsalen Seite (d) aus ungefähr 5 Zellen (Pfeil).

Abb. 69 *Limulus polyphemus*, Beinbasen, S6/S7-Stadium (*Dll*). In den Gnathobasen der Pedipalpen (Pd) und der Laufbeine (Lb) exprimieren ausgedehnte Bereiche *Dll* (Pfeile). Im 4. Laufbeinpaar (außerhalb der Focusebene) umfasst diese Expression deutlich weniger Zellen. Auch ein Zellcluster im Trochanter ist *Dll*-positiv (★). Die Pfeilspitze weist auf eine *Dll*-positive Zelle, die eine Nervenfasern im Inneren des Laufbeines begleitet.

Abb. 70 *Limulus polyphemus*, Blattbeine, S6/S7-Stadium (*Dll*). Die Kante des Genitaloperkulum (=Oa2) sowie des ersten Buchkiemen tragenden Blattbeinpaars (=Oa3) zeigen eine distinkte Expression. Auch die medianen Fortsätze beider Anhangspaare (die des Genitaloperkulum sind bereits reduziert) sind *Dll*-positiv. Auf der ovalen Fläche des Genitaloperkulum zeigen einzelne Zellen eine *Dll*-Expression (Pfeile). Am 4. Laufbein (Lb4) sitzen die *Dll*-positiven Fortsätze, aus denen die Skistock-ähnliche Struktur entsteht.



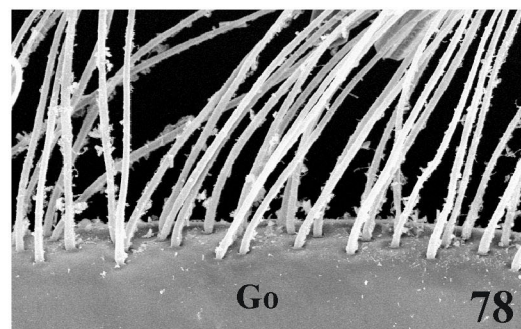
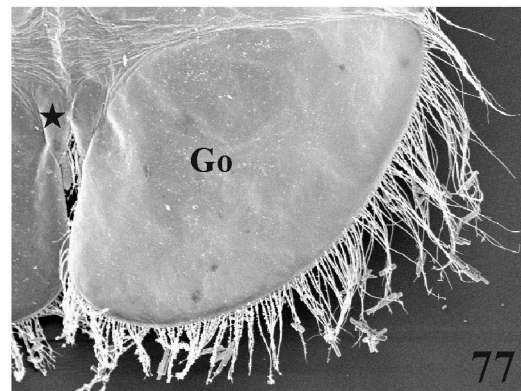
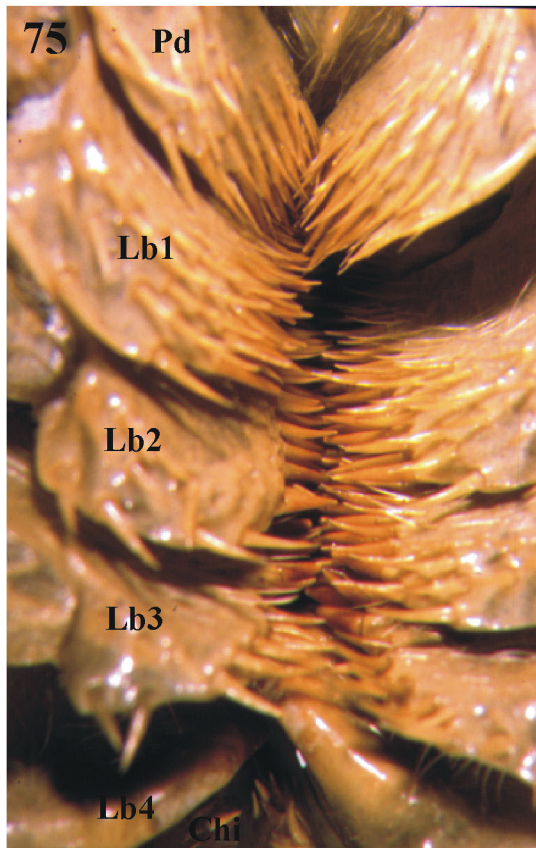
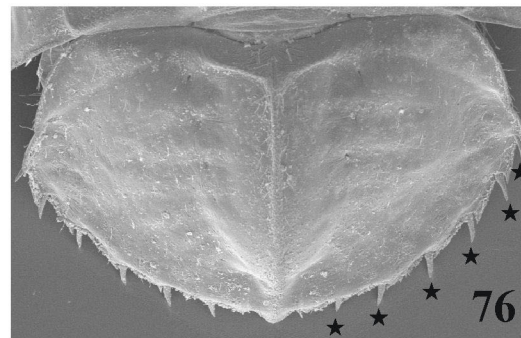
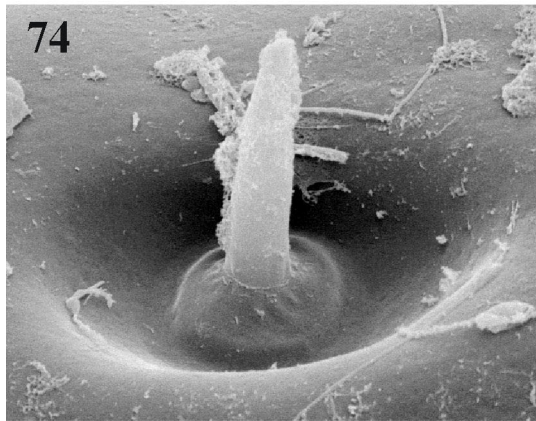
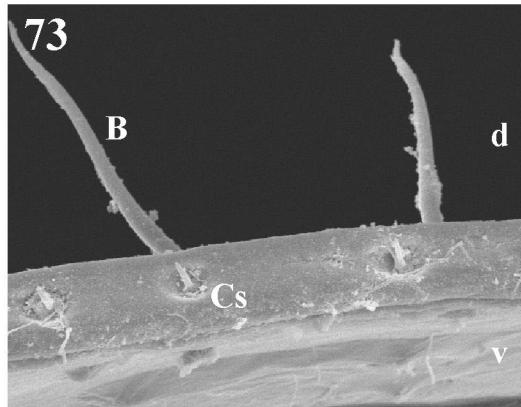
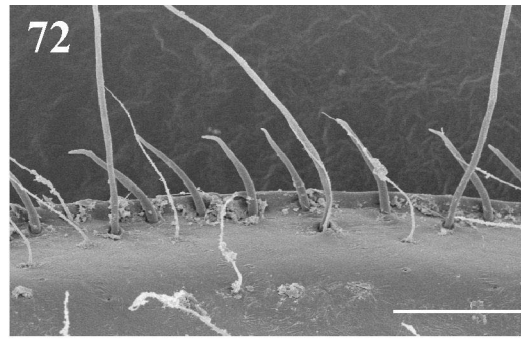
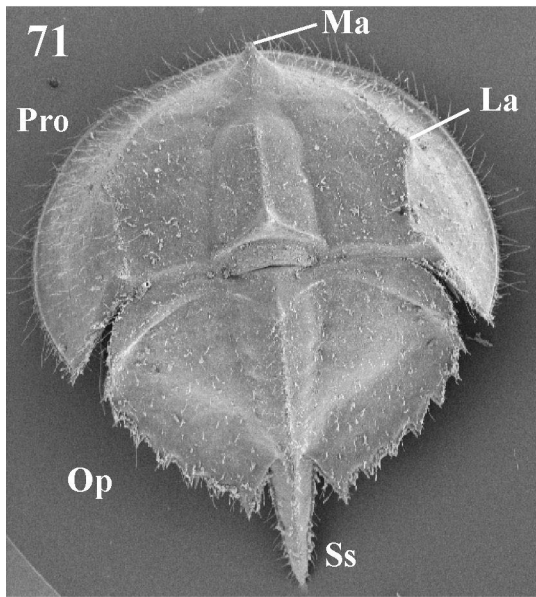


Abb. 71 *Limulus polyphemus*, Larve nach erster postembryonaler Häutung (REM). In der Dorsalansicht erkennt man deutlich die Einteilung in Prosoma (Pro) und Opisthosoma (Op) sowie den Schwanzstachel (Ss). Die gesamte Dorsalseite des Embryos ist mit Borsten bedeckt. La = Lateralauge; Ma = Medianauge.

Abb. 72 *Limulus polyphemus*, Prosomakante von dorsal (REM). Aus dorsaler Ansicht sieht man deutlich die in regelmäßigen Abständen an der Kante sitzenden Borsten, die unterschiedlich kräftig sein können. Scale = 100 µm.

Abb. 73 *Limulus polyphemus*, Prosomakante von ventral (REM). Aus der ventralen Ansicht sieht man die dorsal sitzenden Borsten (B) über die Kante ragen. Auf der Ventralseite sitzen in regelmäßigen Abständen die Conussensillen (Cs). d = dorsal; v = ventral.

Abb. 74 *Limulus polyphemus*, Conussensillum (REM)

Abb. 75 *Limulus polyphemus*, Gnathobasen eines juvenilen Tieres. Der gesamte coxale Bereich der Gnathobasen der Pedipalpen (Pd) und der Laufbeine (Lb) mit Ausnahme des 4. Laufbeines, sind mit vielen beweglich eingelenkten Dornen besetzt. Auch an den Chilaria (Chi) finden sich zahlreiche dieser Dornen. Die gnathobasischen Dornen sind stark innerviert, hier sitzen zahlreiche Chemorezeptoren.

Abb. 76 *Limulus polyphemus*, Lateraldornen (Trilobitenstadium, REM). Am Randbereich des Opisthosomas sieht man die jeweils sechs Lateraldornen (★). Sie sind Sitz unzähliger Rezeptoren.

Abb. 77 *Limulus polyphemus*, Genitaloperkulum von ventral (Trilobitenstadium, REM). Die gesamte Kante des Genitaloperkulum (Go) ist mit langen Borsten besetzt. Die Medianfortsätze (★) sind bereits stark reduziert.

Abb. 78 *Limulus polyphemus*, Detail Genitaloperkulum (Trilobitenstadium, REM). Bei stärkerer Vergrößerung sieht man, daß an der Kante des Genitaloperkulum (Go) ungefähr 3-4 Borsten nebeneinander stehen, allerdings nicht in regelmäßigen Abständen.

III.5.2 *Lepisma saccharina*

III.5.2.1 Ungewöhnliche Expressionen von *Distal-less*

Da für die frühen Embryonalstadien von *Lepisma saccharina* bereits Daten hinsichtlich der *Dll*-Expression vorliegen (Mittmann, 1998; Mittmann & Scholtz, 1998; Scholtz *et al.*, 1998; Mittmann, 2000), werde ich mich hier in erster Linie dem Expressionsmuster späterer Stadien widmen. Die Stadienfestlegung von Mittmann (2000) wird beibehalten.

Neben schon sehr früh auftretenden *Dll*-Expressionen im sich entwickelnden Gehirn des S1-Stadiums (Abb. 79, 83) zeigen sich erste erklärungsbedürftige *Dll*-Expressionen im S2-Stadium in Form von *Dll*-positiven Zellen im proximalsten Bereich beider Maxillenpaare (Daten nicht abgebildet). Aus diesen Bereichen entstehen später Lacinia und Galea (Erste Maxille) sowie Glossa und Paraglossa (Zweite Maxille). Ansonsten zeigt der Maxillarpalpus eine charakteristische distale Expression.

Im S3-Stadium exprimieren sowohl die Lacinia- und die Galeaknospe der ersten Maxille als auch die Glossaknospe der zweiten Maxille *Dll*. Die Expression in der Paraglossaknospe folgt etwas später. Dies ist der erste Nachweis für die *Dll*-Expression in der Paraglossaknospe eines Hexapoden (Mittmann & Scholtz, 2001).

Im S4-Stadium (Abb. 84) zeigt insbesondere der Kopf beachtenswerte Expressionen. Das Expressionsmuster in den Antennen weicht zum ersten Mal vom charakteristischen Muster ab (Abb. 80). Das erste Antennensegment, der zukünftige Scapus, ist bis auf einzelne Zellen, die eher im Inneren des Gliedes zu liegen scheinen, *Dll*-negativ. Im zweiten Antennenglied, dem späteren Pedicellus, finden wir hingegen eine ausgesprochen distinkte Expression. In der restlichen Geißelantenne wird *Dll* in regelmäßigen Streifen exprimiert; darüber hinaus findet man in jedem Annulus einzelne Zellen mit einer überdurchschnittlich starken Färbung (Abb. 80). Auch das Labrum zeigt in diesem Stadium nicht mehr nur die typische distale Expression. In der Nähe des Übergangs zum *Dll*-negativen proximalen Labrumabschnitt findet man einige Zellen mit einer stärkeren Expression (Abb. 80). Auch die Frons des Kopfes zeigt sechs *Dll*-positive Zellen, weiterhin befinden sich zwei *Dll*-exprimierende Zellen direkt lateral des Scheitelpunktes (Abb. 80).

Auch wenn die Mandibeln als einziges Anhangs paar in allen frühen Embryonalstadien *Dll*-negativ sind (siehe auch Scholtz *et al.*, 1998), finden wir im S4-Stadium in jeder Mandibel drei *Dll*-positive Zellen (Abb. 80, 81). Die Maxillenpaare zeigen neben der Expression in den basalen Knospen auch in den Palpen ein ungewöhnliches Expressionsmuster. Der Palpus der ersten Maxille (Maxillarpalpus) besteht aus fünf Gliedern. Eine *Dll*-Aktivität zeigt sich in der distalen Region des fünften Gliedes, in einem Ring von Zellen im vierten Glied, in einzelnen distal gelegenen Zellen des dritten Gliedes sowie in einem Bereich nahe dem Übergang zwischen drittem und zweitem Glied. Die letztgenannte Expression scheint schwächer und schwammiger zu sein als die übrigen. Zählt man den Palpiger nicht als Teil des Prämentums, sondern als proximalstes Palpusglied, dann besteht der Labialpalpus (zweite Maxille) aus vier Gliedern. Das vierte Glied zeigt bis auf einen schmalen proximalen Bereich eine distinkte *Dll*-Färbung (Abb. 81). Im dritten Glied findet

man hingegen nur wenige in einem Kreis angeordnete sowie eine oder zwei einzelne *Dll*-positive Zellen. Wiederum zeigt sich nahe dem Übergang von drittem zu zweitem Glied eine ebenfalls schwammigere Expression. Im ersten Labialpalpusglied findet man keine oder nur eine sehr unklare Expression einzelner Zellen.

Auch das Expressionsmuster in den Thoraxbeinen zeigt im S4-Stadium einige Veränderungen im Vergleich zu früheren Stadien. Der Tarsus und die Hälfte der Tibia zeigen eine distinkte *Dll*-Expression, wohingegen der Übergangsbereich zwischen Tibia und Femur diffus erscheint; nur wenige einzelne Zellen sind deutlich *Dll*-positiv. Im proximalen Drittel des Femurs finden wir hingegen wieder eine deutliche *Dll*-Expression, die sich noch über die halbe Länge des großen Trochanters erstreckt. Die Coxa ist *Dll*-negativ.

Die Expression in den Cerci und dem Terminalfilum ähnelt derjenigen der Antennen. Mit Ausnahme des proximalen Bereiches wird *Dll* in regelmäßigen Streifen in den gesamten Anhängen exprimiert (Abb. 82). Darüber hinaus findet man eine *Dll*-positive Zellreihe auf jeder Analvalve. Auch an den Seiten jedes Abdominalsegments befinden sich einzelne Zellen, die *Dll* exprimieren.

III.5.2.2 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

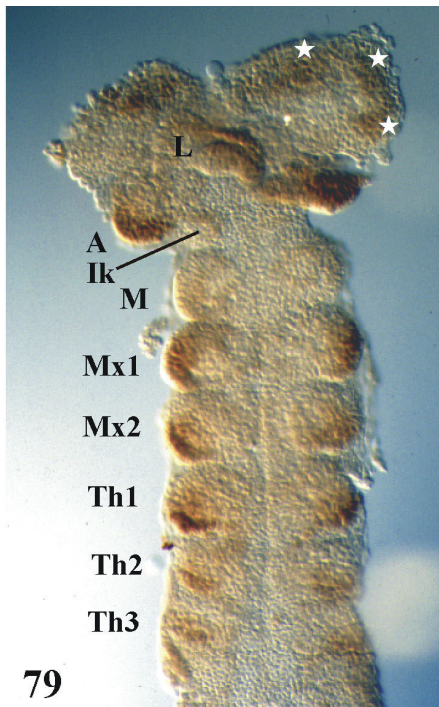
Auch die REM-Untersuchungen an Larvalstadien von *Lepisma saccharina* ergeben eine deutliche räumliche Korrelation zwischen den im letzten Abschnitt beschriebenen *Dll*-Expressionen und verschiedenen Sinnesorganen. Die Antennen von *Lepisma saccharina* beherbergen sehr vielfältige Sensillen. Adel (1984) beschreibt neun unterschiedliche Rezeptoren. Da diese Rezeptoren von unterschiedlichen Autoren unterschiedliche Bezeichnungen erhielten und sich darüber hinaus einige Mechanorezeptoren während der postembryonalen Entwicklung in andere Typen modifizieren, verwende ich in einigen Fällen allgemeine Namen. Ansonsten folge ich der Namensgebung von Larink (1982, 1983).

In den Antennen des Schlupfstadiums von *Lepisma saccharina* tragen das zweite Glied sowie alle Annuli mit Ausnahme des dritten und fünften einen Ring von Setae (Abb. 85, 86). Darüber hinaus findet man mindestens in jedem zweiten Annulus eiförmige Sinnesorgane (Abb. 86). Larink (1982) bezeichnet diese antennalen Rezeptoren als Setae, Sensilla trichobothria und als Sensilla basiconica, wobei es sich bei letzterer um einen Chemorezeptor handelt. In späteren Stadien finden wir auch am ersten und dritten Annulus einen Kranz aus Setae.

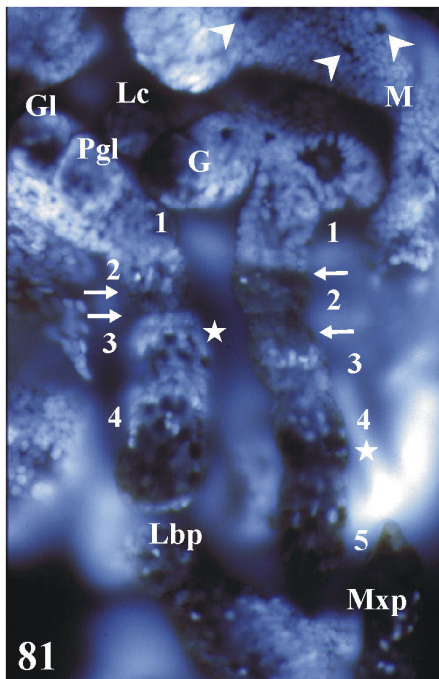
Das Labrum weist im proximalen Bereich eine Querreihe von vier Setae auf und ein weiteres Cluster von sechs Setae nahe der Labrumspitze (Abb. 87). Darüber hinaus sitzen an der Frons drei Paar Setae, und auch auf dem Scheitel finden wir zwei Paar Setae unterschiedlicher Größe (Abb. 87). Im Verlauf der weiteren Entwicklung wird die Anzahl aller genannten Setae um ein Vielfaches vermehrt.

Im lateralen Bereich der Mandibel finden wir drei Borsten (Abb. 87). Die Maxillen, insbesondere die Palpen, weisen eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren auf. An der Spitze des fünften Gliedes des Maxillarpalpus sitzen beispielsweise Mechanorezeptoren, Chemorezeptoren und Drüsenhaare (Abb. 88). Das vierte, dritte und zweite Glied trägt

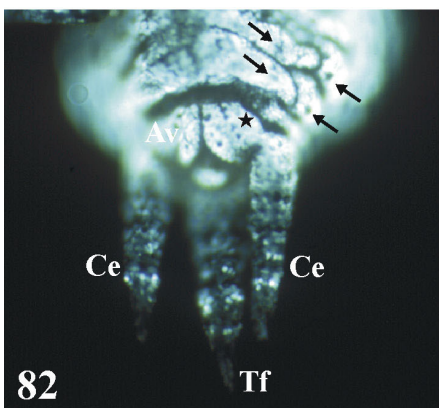
jeweils einen Kranz von Setae (Abb. 88). Auch im Labialpalpus finden wir ähnliche Korrelationen. Wiederum beherbergt das distalste (vierte) Palpusglied verschiedene Rezeptoren (Abb. 89, 90), in erster Linie jedoch Sensilla trichodea, scharfe, gebogene Borsten. Weiterhin findet man verschiedene Formen von Sensilla basiconica (Larink, 1978) und fünf sogenannte Komplexsensillen (Abb. 90, Larink, 1978, 1982, 1983). Bei den zylinderförmigen Komplexsensillen existieren Hinweise darauf, daß es sich hierbei um Chemorezeptoren handelt (Larink, 1978). Im dritten Segment findet man wenige Setae in einem Ring und ein oder zwei einzelne, wohingegen ein deutlicher Kranz von Setae das zweite Glied umgibt (Abb. 89). Nur eine einzelne Borste konnte im ersten Glied gefunden werden. Auch die Sensillenanzahl auf den Palpen wird postembryonal vermehrt (Larink, 1978; eigene Beobachtung). Wie schon bei der *Dll*-Expression finden wir auch bei den REM-Untersuchungen große Ähnlichkeiten zwischen Antennen und Cerci respektive Terminalfilum. Außer im proximalsten Bereich beherbergt jedes Cercumglied respektive Terminalfilumglied im distalen Bereich einen Kranz von gelenkig mit der Cuticula verbundenen Borsten (Abb. 91). Auf den zwei Laminae subanales befindet sich je eine Reihe von Setae (Abb. 91), und auch in jedem Abdominalsegment sitzen am Rande der Lateral- und Ventralplatten einzelne Setae (Abb. 91).



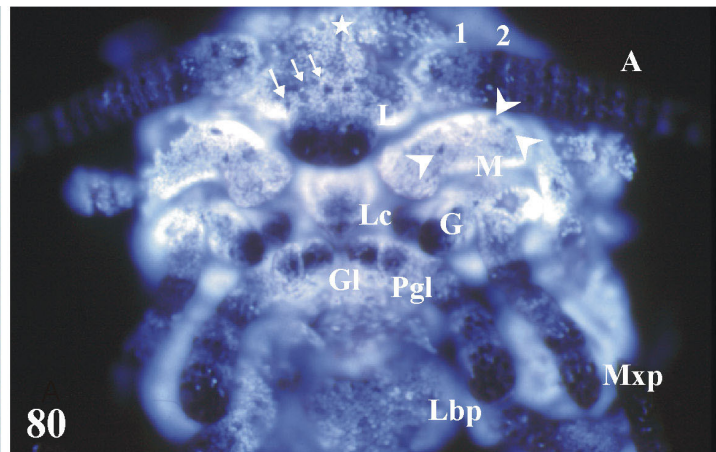
79



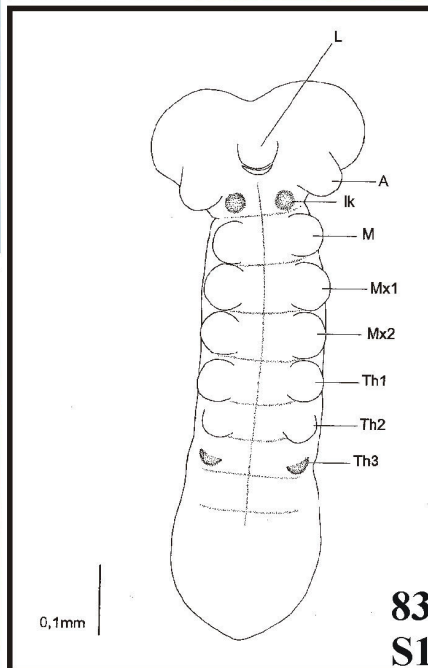
81



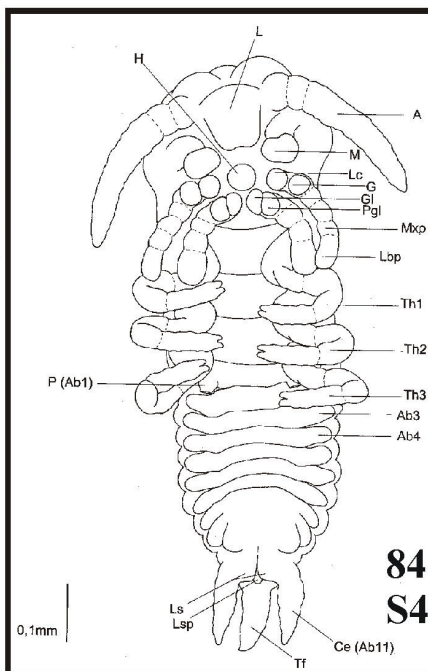
82



80



83
S1



84
S4

Abb. 79 *Lepisma saccharina*, Embryo im S1-Stadium (*Dll*). Alle auswachsenden Knospen mit Ausnahme der Mandibel (M) zeigen die typische distale Expression. Auch das Labrum (L) exprimiert *Dll*. Im dritten Thorax-segment (Th3) sehen wir noch die prämorphogenetische Expression, die dem Auswachsen der Knospe vorausgeht. Im Gehirn exprimieren alle drei sich entwickelnden Gehirnloben *Dll* (★). A = Antenne; Ik = Interkalar-segment; Mx = Maxille.

Abb. 80 *Lepisma saccharina*, Frontalansicht des Kopfes (S4-Stadium, *Dll*). In den Maxillar- und Labialpalpen (Mxp, Lbp) wechseln sich *Dll*-positive und *Dll*-negative Bereiche ab. Die vier Endite der beiden Maxillen (Lacinia = Lc; Galea = G; Glossa = Gl; Paraglossa = Pgl) zeigen eine distinkte Expression. Die Antennen (A) zeigen ein regelmäßiges, streifenförmiges Expressionsmuster, wobei die Expression im Pedicellus (2) stärker ist als in den anderen Gliedern. Die Pfeile weisen auf drei der sechs *Dll*-positiven Zellen an der Frons. Drei einzelne Zellen auf den Mandibeln (Pfeilspitzen) sowie einzelne Zellen auf dem Kopf (★) exprimieren ebenfalls *Dll*. L = Labrum.

Abb. 81 *Lepisma saccharina*, Maxille und Labium (S4-Stadium, *Dll*). Alle vier Maxillenloben sind *Dll*-positiv, zeigen zumindest größere *Dll*-positive Bereiche. Die Palpenglieder sind fortlaufend nummeriert. Die distalsten Glieder beider Palpen zeigen eine starke Expression, während in jedem benachbarten Glied →

➡ unterschiedlich angeordnete Zellcluster (Kranz, Grüppchen) *Dll* exprimieren (★). Weiterhin ist in beiden Fällen der Übergang zwischen dem 2. und 3. Palpusglied *Dll*-positiv (Pfeile; im Labialpalpus (Lbp) etwas außerhalb der Focusebene); diese Expression scheint jedoch schwächer zu sein als an den Palpusspitzen. Die Pfeilspitzen markieren die drei einzelnen *Dll*-positiven Zellen in der Mandibel (M). G = Galea; Gl = Glossa; Lc = Lacinia; Mxp = Maxillarpalpus; Pgl = Paraglossa.

Abb. 82 *Lepisma saccharina*, Posteriores Ende, (S4-Stadium, *Dll*). Die Cerci (Ce) und das Terminalfilum (Tf) zeigen ein streifenförmiges *Dll*-Expressionsmuster, ganz ähnlich dem der Antenne. In den Analvalven (Av) exprimiert eine Zellreihe (★) sowie einige einzelne Zellen *Dll*. Die Pfeile markieren die *Dll*-positiven Zellen der Lateral- und der Ventralplatten.

Abb. 83 *Lepisma saccharina*, Embryo im S1-Stadium. Zeichnung eines Embryo im S1-Stadium. A = Antenne; Ik = Interkalarsegment; L = Labrum; M = Mandibel; Mx = Maxille; Th = Thoraxsegment.

Abb. 84 *Lepisma saccharina*, Embryo im S4-Stadium. Zeichnung eines Embryo im S4-Stadium. A = Antenne; Ab = Abdominalsegment; G = Galea; Gl = Glossa; H = Hypopharynx; Ik = Interkalarsegment; L = Labrum; Lbp = Labialpalpus; Ls = Lamina subanalis; Lsp = Lamina supraanalis; M = Mandibel; Mxp = Maxillarpalpus; P = Pleuropodium; Pgl = Paraglossa; Th = Thoraxsegment.

Abb. 85 *Lepisma saccharina*, Mittelteil einer Antenne (Erstes postembryonales Stadium, REM). Jeder Annulus der Antenne trägt einen Kranz von Borsten. In diesem Stadium findet sich zumindest in jedem zweiten Segment eine Sensilla basiconica (siehe auch Abb. 86).

Abb. 86 *Lepisma saccharina*, Antennenannulus (Erstes postembryonales Stadium, REM). In regelmäßigen Abständen sitzen die Borsten kranzförmig um das Antennenglied herum. Der Pfeil deutet auf die Sensilla basiconica. Scale = 10µm.

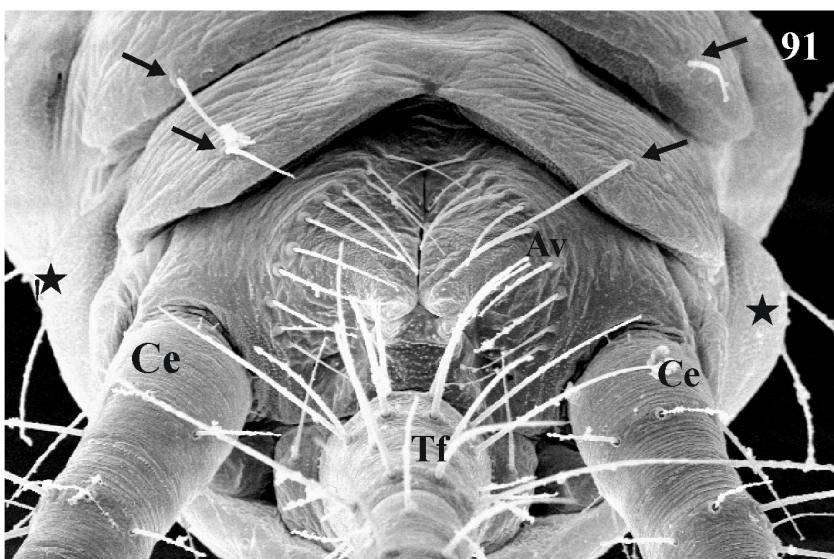
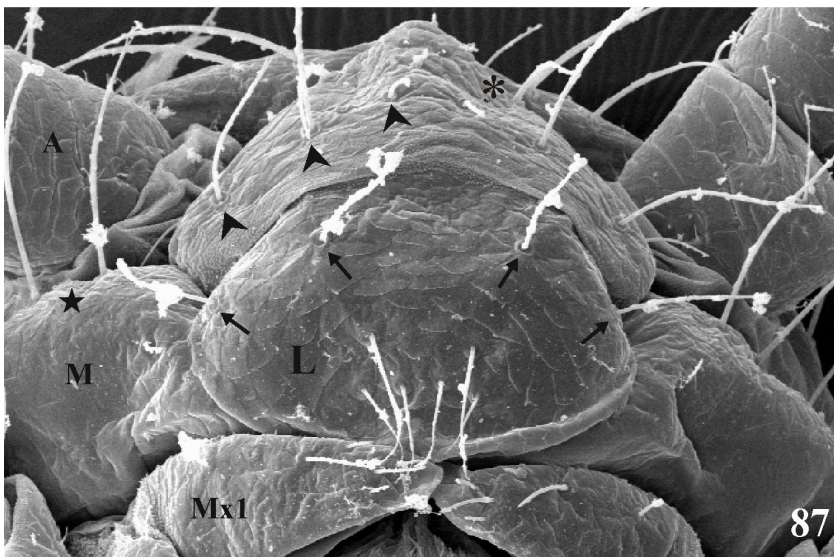
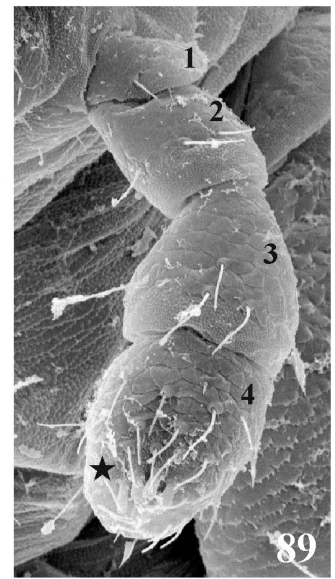
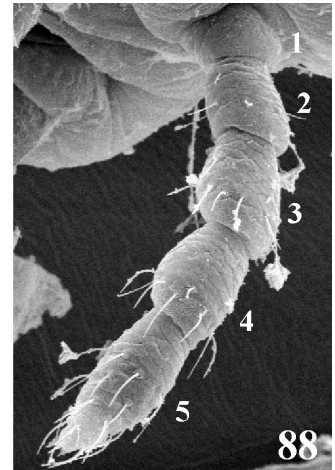
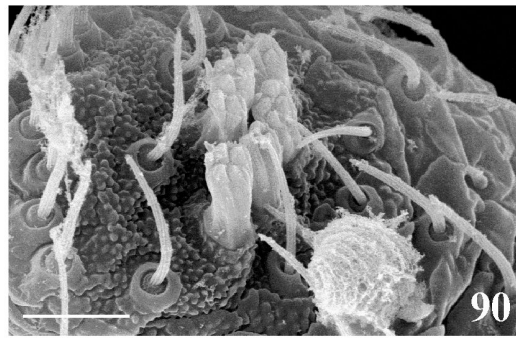
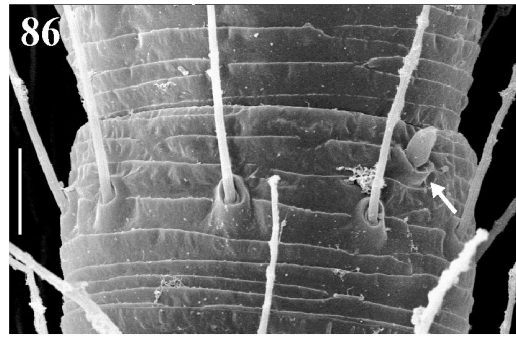
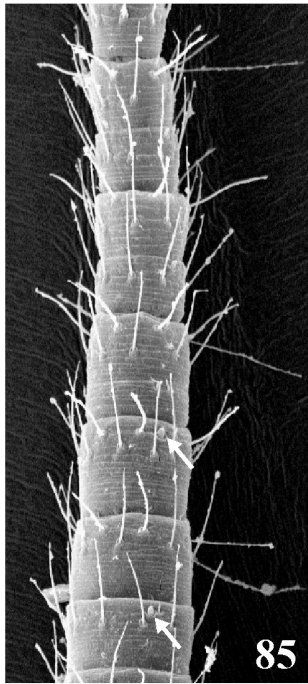
Abb. 87 *Lepisma saccharina*, Frontalansicht des Kopfes (Erstes postembryonales Stadium, REM). Auf der Spitze des Labrums (L) sitzen sechs Borsten, etwas weiter proximal weitere vier Borsten (Pfeile). Die Pfeilspitzen markieren drei der sechs Borsten auf der Frons. Auf dem Kopf kann man nur eine der zwei Borsten sehen (★). Seitlich neben dem ★ sieht man zwei der drei Borsten auf den Mandibeln (M). A = Antenne; Mx = Maxille.

Abb. 88 *Lepisma saccharina*, Maxillarpalpus (Erstes postembryonales Stadium, REM) Der distale Bereich des 5. Maxillarpalpusgliedes (5) ist mit Borsten besetzt. Im 4., 3. und 2. Glied (4, 3, 2) findet man hingegen nur einen Kranz von Borsten im distalen Bereich.

Abb. 89 *Lepisma saccharina*, Labialpalpus (Erstes postembryonales Stadium, REM). Der distale Teil des 4. Labialpalpusgliedes (4) ist mit Sinnesorganen übersät. Die größten sind die fünf sogenannten Komplexsensillen (★, siehe auch Abb. 90). Im 3. und 2. Glied (3, 2) findet man nur einen Kranz von Borsten respektive noch die eine oder andere einzelne Borste.

Abb. 90 *Lepisma saccharina*, Labialpalpuspitze (Erstes postembryonales Stadium, REM). An der Spitze des Labialpalpus befinden sich neben zahlreichen verschiedenen Borstentypen auch die fünf säulenartigen Komplexsensillen, die vermutliche Chemorezeptoren sind. Am häufigsten sind Sensilla trichoidea vertreten, scharf gebogene Borsten.

Abb. 91 *Lepisma saccharina*, Posteriores Ende (Erstes postembryonales Stadium, REM). Die Cerci (Ce) und das Terminalfilum (Tf) tragen in regelmäßigen Abständen Kränze von Borsten. Auf jeder Analvalve (Av) befindet sich eine Reihe von Borsten. Die Pfeile markieren die Borsten auf den Ventralplatten, die Sterne diejenigen auf den Lateralplatten.



III.5.3 Anti-*Distal-less*/Anti-Synorfl-Doppelmarkierungen

Neben den REM-Untersuchungen, die bereits einen (indirekten) Hinweis auf eine Korrelation zwischen *Dll* und Aspekten der Neurogenese lieferten, wurden weitere Daten mittels immunhistochemischer Methoden erhoben. Dazu wurden an verschiedenen Stadien von *Limulus polyphemus* und *Lepisma saccharina* Doppelmarkierungen mit Anti-*Dll*-Antikörper sowie Anti-Synorfl-Antikörper vorgenommen, um mögliche Korrelationen oder auch Koexpressionen zu untersuchen. Von *Limulus polyphemus* wurden insbesondere S4- und S7-Stadien ausgewertet, von *Lepisma saccharina* das S4-Stadium. Diese Doppelmarkierungen erbrachten bei beiden Organismen insofern eine Übereinstimmung, als in keinem untersuchten Gewebe eine zelluläre Koexpression der beiden Marker vorkommt. Die *Dll*-positiven Zellen begleiten oft in großer Anzahl die Axonstränge; darüber hinaus findet man sie vergesellschaftet mit Nervenzellclustern. Insbesondere bei *Lepisma saccharina* begleiten sie die Konnektive und Kommissuren des ZNS.

III.5.3.1 *Limulus polyphemus*

Der Lobus opticus von *Limulus polyphemus* zeigt im S4/S5-Stadium folgendes Muster: Der von der Protocerebralbrücke verlaufende dicke Nervenstrang weist eine sehr distinkte Synorfl-Färbung auf; dieser Strang wird von einigen *Dll*-positiven Zellen begleitet (Abb. 92). Im optischen Lobus selber sind nicht alle Zellen Synorfl-markiert, sondern eher die der medianen Hälfte (Abb. 92, 93). Auch im Medianlobus zeigen zahlreiche Zellen eine Synorfl-Färbung (Abb. 92). *Dll*-positive Zellen finden sich im Lobus opticus vereinzelt oder in kleinen Grüppchen über den gleichen Bereich der Synorfl-positiven Zellen verteilt (Abb. 92, 93). Schwer zu unterscheiden ist, ob die *Dll*-positiven Zellen auf oder zwischen den Synorfl-gefärbten Zellen sitzen. Die Anzahl der *Dll*-positiven Zellen ist erheblich geringer als die der Synorfl-positiven Nervenzellen. Auch im Medianlobus finden sich *Dll*-exprimierende Zellen zwischen respektive auf den Synorfl-positiven Zellen.

Im ZNS finden sich neben einer starken Synorfl-Aktivität auch Cluster von *Dll*-exprimierenden Zellen im medianen Bereich der in Abschnitt III.5.1.2 erwähnten Ganglien (Abb. 94). Die *Dll*-positiven Zellen liegen entlang der Konnektive und verstärkt an den Ganglien. Die Kommissuren werden durch Anti-Synorfl-Antikörper nicht oder nur extrem schwach gefärbt (Abb. 94). Die Zellzahl der *Dll*-positiven Zellen hat sich während der Embryonalentwicklung gesteigert.

Am Prosomarand befinden sich verschiedene Synorfl-markierte Zellcluster, die über vom ZNS kommende Axone innerviert werden und teils miteinander verbunden sein können (Abb. 95A). Die Zuordnung dieser Zellcluster zu einzelnen Sinnesorganen ist äußerst schwierig, da im selben Bereich mehrere voneinander unabhängige Cluster übereinander liegen können. Die Innervierung einer Randborste scheint folgendermaßen zu verlaufen: Vom ZNS verläuft in Richtung Prosomarand ein Axonbündel, das relativ nahe beim Rand ein Cluster von vier oder fünf Nervenzellen aufweist. Fast direkt hinter diesem Cluster trifft man auf eine axonale Gabelung, deren eines Axon rasch in eine größere Gruppe von Nervenzellen mündet. Das andere Axon verläuft bis weit in die Borste hinein (Abb. 95A). Tatsächlich ist es jedoch sehr problematisch, ohne Einzelmarkierungen von

auswachsenden Axonen den genauen Verlauf und die Zugehörigkeit von Nervenzellen zu bestimmen.

Ähnliches gilt für die *Dll*-exprimierenden Zellen, denn auch hier liegen verschiedene, unabhängige Cluster im selben Bereich auf unterschiedlichen Focusebenen. Der basale Bereich des Axonbündels, das in eine Randborste mündet, liegt in einem Cluster *Dll*-positiver Zellen (Abb. 95B). In den Borsten selber finden sich keine weiteren zellulären Strukturen. Immer wieder findet man beim Fokussieren *Dll*-positive Zellen an Axonen, teils in dichten Clustern oder auch in unmittelbarer Nähe zu Nervenzellen respektive Nervenzellclustern. Eine genaue Zuordnung ist mit den angewendeten Methoden jedoch nicht möglich. Auffallend häufig findet man jedoch ein blümchenförmiges Cluster *Dll*-exprimierender Zellen, die ein Axon umgeben (Abb. 97, 98).

Auch in den opisthosomalen Lateraldornen findet man eine enge Korrelation von Nervenzellen, Axonen und *Dll*-exprimierenden Zellen (Abb. 96, 97, 98). Auf den ersten Blick scheint diese Doppelmarkierung eher zu verwirren, jedoch ist in diesem Bereich die Zuordnung zumindest teilweise leichter. Betrachtet man zuerst die *Synorfl*-Expressionen, so findet man vom medianen Opisthosomaabschnitt kommend Axonbündel, die im proximalen Bereich der Lateraldornen in ein großes Nervenzellcluster münden (Abb. 96A). Von diesem Zellcluster aus verlaufen verschiedene weitere Axonstränge. Ein Strang zieht in posteriore Richtung, mündet rasch in ein weiteres Zellcluster, von wo aus ein weiterer Nervenstrang in die gelenkig verbundene Cuticulaspitze der Lateraldornen verläuft (Abb. 96); dabei erstreckt er sich ungefähr über die Hälfte der Länge der Cuticuladorne (Abb. 96). Ein weiterer Axonstrang verläßt das proximale Cluster und endet in einer kleineren Gruppe von Nervenzellen (Abb. 96). Auch scheint der gesamte Lateraldornenbereich von zahlreichen winzigen Nervenfasern durchsetzt zu sein (Abb. 96, 97; Film 6). Darüber hinaus verlassen aber noch einige Faserbündel das proximale Cluster, die abrupt in kleinen, keulenförmigen Verdickungen enden (Abb. 96), scheinbar in offenen Nervenendigungen oder in synaptischen Endknöpfchen. Kombiniert man diese Muster mit einer *Dll*-Expression, so ergibt sich, daß jedes dieser stumpfen Enden von einem Kranz von ca. fünf bis sieben *Dll*-positiven Zellen umgeben ist (Abb. 96). Weiterhin findet man in dem Bereich, in dem der bewegliche Dorn am Opisthosoma eingelenkt ist, eine größere Ansammlung *Dll*-exprimierender Zellen (Abb. 97). Auch der Axonstrang, der direkt in den beweglichen Dorn zieht, ist von etlichen *Dll*-positiven Zellen begleitet (Abb. 96).

Das Flabellum wird von zwei oder mehreren großen Nervensträngen innerviert, die im proximalen Flabellumbereich jeweils in ein größeres Zellcluster münden (Abb. 99). Von diesen Clustern ziehen mehrere Axonbündel in den distalen Flabellumbereich, wo sie in kleinen keulenförmigen Verdickungen enden (Abb. 99). *Dll* wird mit Ausnahme des proximalsten Bereiches in der gesamten Flabellumknospe exprimiert (Abb. 99); allerdings scheint die Expression im proximalen Abschnitt etwas schwächer zu sein. Ob die stumpfen Nervenenden wiederum kreisförmig von *Dll*-positiven Zellen umgeben sind, konnte wegen der distinkten Gesamtexpression nicht mit Sicherheit festgestellt werden.

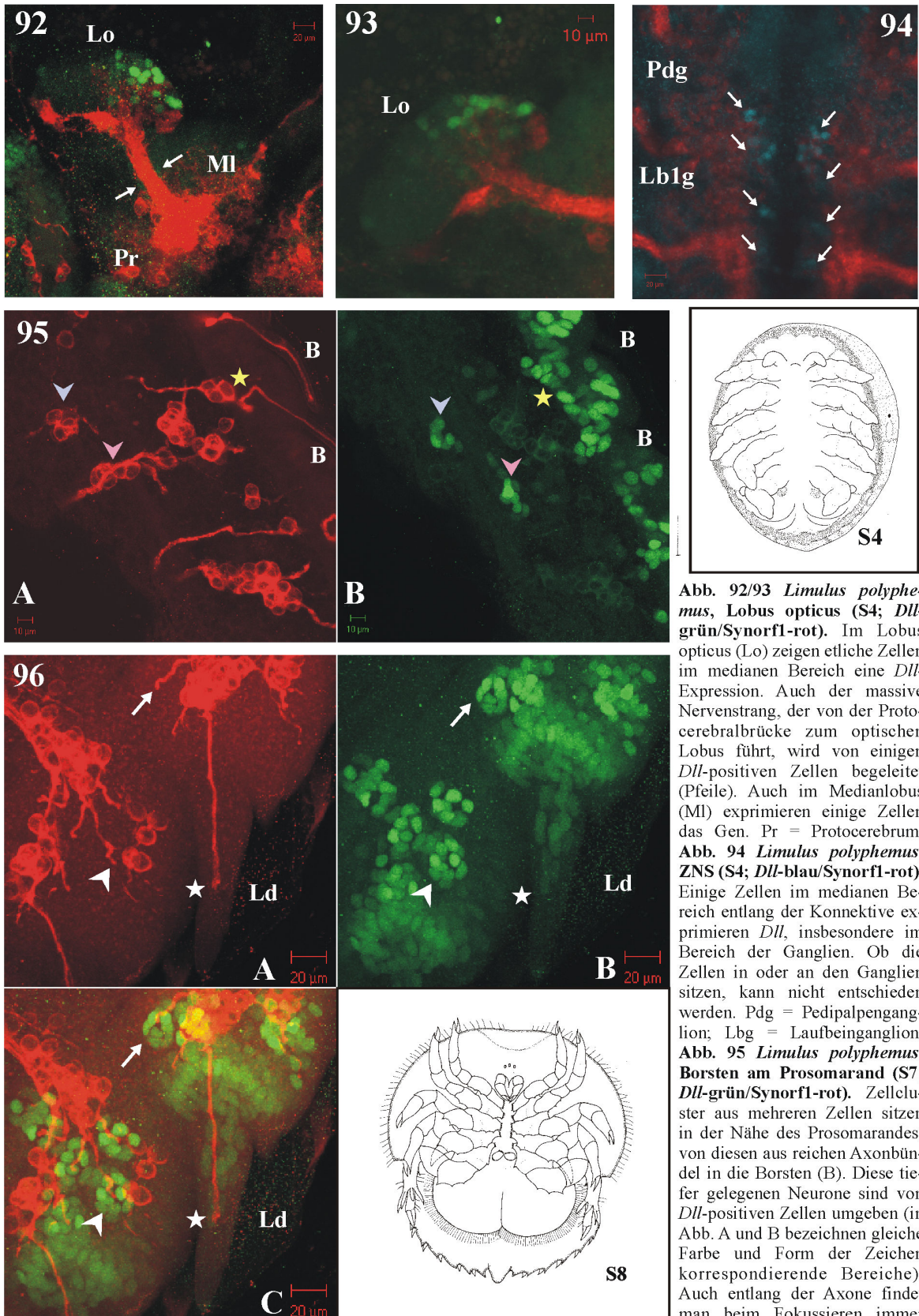


Abb. 92/93 *Limulus polyphemus*, Lobus opticus (S4; *Dll*-grün/*Synorfl*-rot). Im Lobus opticus (Lo) zeigen etliche Zellen im medianen Bereich eine *Dll*-Expression. Auch der massive Nervenstrang, der von der Proto-cerebralbrücke zum optischen Lobus führt, wird von einigen *Dll*-positiven Zellen begleitet (Pfeile). Auch im Medianlobus (MI) exprimieren einige Zellen das Gen. Pr = Protocerebrum.

Abb. 94 *Limulus polyphemus*, ZNS (S4; *Dll*-blau/*Synorfl*-rot). Einige Zellen im medianen Bereich entlang der Konnektive exprimieren *Dll*, insbesondere im Bereich der Ganglien. Ob die Zellen in oder an den Ganglien sitzen, kann nicht entschieden werden. Pdg = Pedipalpenganglion; Lbg = Laufbeinganglion.

Abb. 95 *Limulus polyphemus*, Borsten am Prosomarand (S7; *Dll*-grün/*Synorfl*-rot). Zellcluster aus mehreren Zellen sitzen in der Nähe des Prosomarandes; von diesen aus reichen Axonbündel in die Borsten (B). Diese tiefer gelegenen Neurone sind von *Dll*-positiven Zellen umgeben (in Abb. A und B bezeichnen gleiche Farbe und Form der Zeichen korrespondierende Bereiche). Auch entlang der Axone findet man beim Fokussieren immer

wieder *Dll*-positive Zellen. Insbesondere im Bereich der gelenkigen Verbindung der Borste mit dem Prosoma sitzen zahlreiche *Dll*-positive Cluster. Abb. 96 *Limulus polyphemus*, Lateraladornen (S7; *Dll*-grün/*Synorfl*-rot). Auch im Bereich der Lateraladornen (Ld) ist die Korrelation eindeutig. Das Axonbündel, das tief in den Lateraladornen hineinreicht, wird exakt bis zu seinem Ende (★) von *Dll*-positiven Zellen begleitet. Häufig finden wir von Neuronenclustern ausgehend einzelne Axonbündel, die eher in offenen Nervenendigungen zu enden scheinen; diese sind immer von *Dll* exprimierenden Zellen umgeben, meist in einem blümchenförmigen Cluster (Pfeil, Pfeilspitze). Wiederum ist die *Dll*-Expression im Bereich der gelenkigen Verbindung von Opisthosoma und Lateraladornen besonders ausgeprägt.

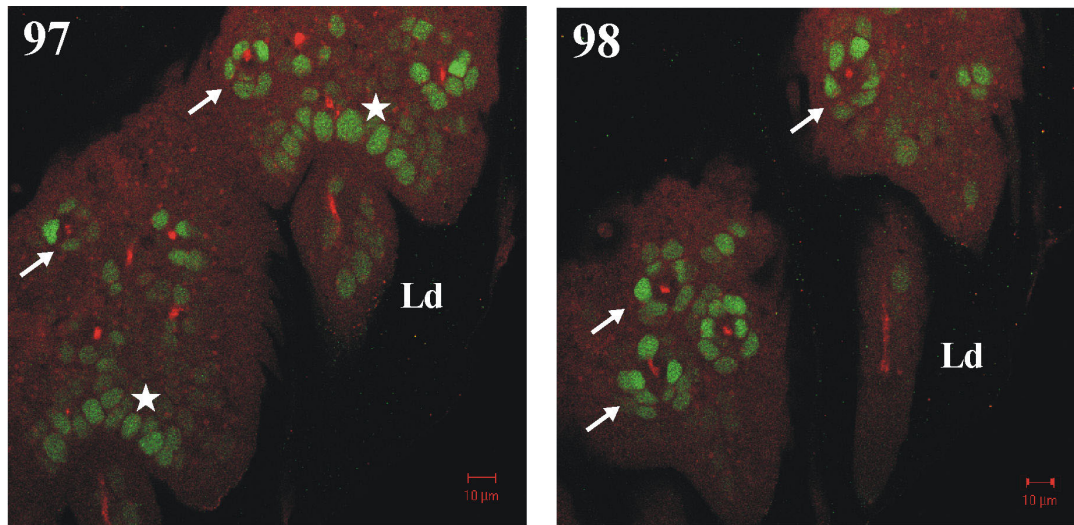


Abb. 97/98 *Limulus polyphemus*, Lateraldornen (S7; *Dll*-grün/Synorfl1-rot). Fokussiert man durch die Lateraldornen (Ld) hindurch, so findet man die Axone von *Dll*-positiven Zellen umgeben. Häufig umringen die *Dll*-positiven Zellen ein Axon in einer blümchenähnlichen Formation (Pfeile). Die besonders massive Ansammlung *Dll*-positiver Zellen im Bereich der gelenkigen Verbindung von Lateraldornen und Opisthosoma ist durch den Stern markiert (Abb. 97).

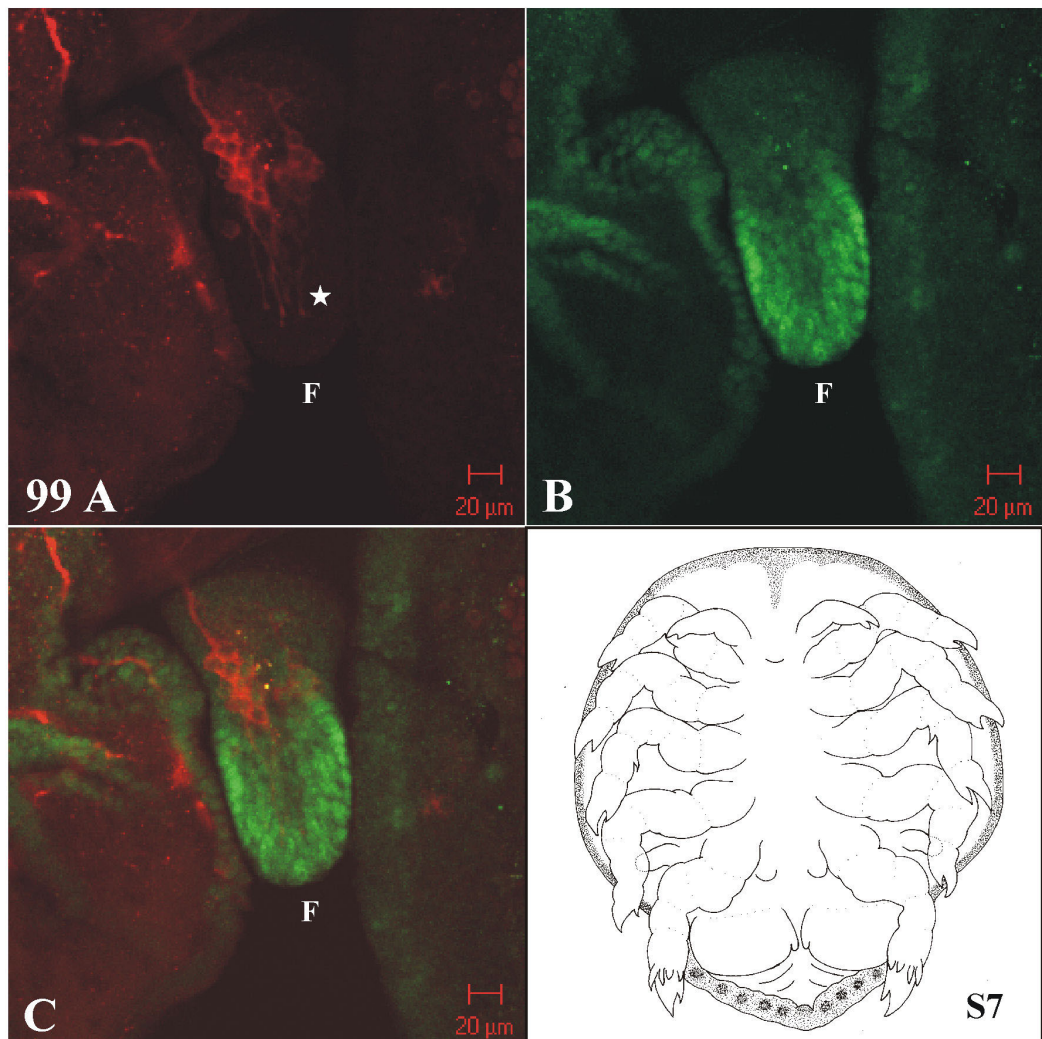


Abb. 99 *Limulus polyphemus*, Flabellum (S7; *Dll*-grün/Synorfl1-rot). Zwei oder mehr massive Nervenstränge innervieren das Flabellum (F); sie münden im Inneren in eine großes traubenförmiges Zellcluster. Von dort aus ziehen etliche Axonbündel in den distalen Flabellumbereich und scheinen in offenen Nervenendigungen zu enden (★). Da der gesamte distale Anteil des Flabellums massiv *Dll* eprimiert, konnten keine spezifischen Zellanordnungen festgestellt werden.

III.5.3.2 *Lepisma saccharina*

Auch bei *Lepisma saccharina* erlaubt die Doppelmarkierung des S3- und S4-Stadiums einen weitergehenden Einblick. Im ZNS sind die Konnektive, Kommissuren und Ganglien von zahlreichen *Dll*-exprimierenden Zellen umgeben (Abb. 100). Dieses Expressionsmuster setzt sich auch im ganzen Kopf fort, wo der gesamte Neuropilring mitsamt Protocerebrum von *Dll*-positiven Zellen begleitet wird (Abb. 101). Fokussiert man in einen oberflächlicheren Bereich, stößt man auf die Innervierung des Labrums (Abb. 102, 103). Auch an diesen Axonen finden wir *Dll*-positive Zellen (Abb. 103). Im gesamten Kopf verteilt exprimieren zahlreiche Zellen *Dll*; ihre Anzahl nimmt im Verlauf der Embryonalentwicklung zu (Abb. 101).

Die Antenne wird von einem sich rasch verzweigenden, massiven, vom Deutocerebrum kommenden Strang innerviert (Abb. 102, 103, 104). Dieser Strang zieht sich durch die gesamte Antenne und wird über die ganze Länge von einzelnen *Dll*-positiven Zellen begleitet (Abb. 102, 103, 104). Im ersten Antennenglied, dem zukünftigen Scapus, finden wir mehrere Cluster von Nervenzellen, die wie ein Nervennetz erscheinen (Abb. 103, 104). Auch der proximale Bereich des zweiten Antennengliedes, des zukünftigen Pedicellus, zeigt mehrere Nervenzellgruppen, allerdings sind diese kleiner als im Scapus (Abb. 104). Einige der Nervennetzzellgruppen beider Glieder sind direkt – nicht über dem zentral verlaufenden Strang – miteinander verbunden (Abb. 104). Auch von den Nervenzellclustern im Pedicellus ziehen einige Axone nach distal in den Grenzbereich zum nächsten, dritten Antennenglied. Das Pedicellus-Glied zeigt eine ausgeprägte *Dll*-Expression (Abb. 103, 104).

Im Maxillar- und Labialpalpus bietet sich ein ähnliches Bild (Abb. 105, 106). Beide Palpen werden vollständig von einem vom ZNS kommenden Nervenstrang durchzogen; von diesem zweigen Faserbündel in die Knospen von Lacinia, Galea sowie Glossa und Paraglossa ab. Im Maxillarpalpus findet man zentral in den Knospen von Lacinia und Galea eine Ansammlung von netzartig angeordneten Nervenzellen. Anscheinend reichen einige Nervenenden in beiden Knospen bis zur Oberfläche (Abb. 105, 106). Auch im restlichen Maxillarpalpus findet man zentrale Nervenzellcluster (Abb. 106). *Dll*-exprimierende Zellen zeigen sich auf der gesamten Oberfläche von Lacinia und Galea, im zweiten und den weiteren distalen Gliedern wie in Abschnitt III.5.2.1 beschrieben (Abb. 105, 106). Auch im Labialpalpus finden wir eine entsprechende Korrelation zwischen *Dll*-Expression und im jeweiligen Palpusglied liegenden Nervenzellclustern (Abb. 106). Einzige Ausnahme bildet in beiden Fällen das erste Palpusglied, in das sich zwar der zentrale Nervenstrang auch mit Zellclustern fortsetzt, in dem sich jedoch keine oder nur eine äußerst unsicher zu bestimmende *Dll*-Expression nachweisen läßt.

In den Thoraxbeinen finden wir einen massiven Zentralstrang, der sich in verschiedenen Gliedern immer wieder in nervennetzähnliche Zellansammlungen aufspaltet (Abb. 107). In der Coxa finden wir ein mehrsträngiges Nervenbündel mit Zellclustern, das im Übergangsbereich zum Trochanter wieder in einen massiven Strang mündet (Abb. 107). Im distalen Trochanterbereich setzt eine distinkte *Dll*-Expression ein, die sich bis in den mittleren Femurbereich in unverminderter Stärke fortsetzt (Abb. 107, 108). Im Innern des Femur befinden sich wiederum zwei verzweigte Neuronennetze (Abb. 108). Einige Fasern

verbinden die beiden femuralen Nervennetz direkt miteinander (Abb. 107). Bis zur Hälfte der Tibia scheint die *Dll*-Expression schwächer zu sein, auch das Nervennetz ist bei weitem nicht so ausgeprägt. In der distalen Tibia nehmen sowohl Nervennetz als auch *Dll*-Expression wieder zu (Abb. 108). Einige der in der Tibia verzweigten Stränge ziehen bis in die Spitze des Tarsus, der eine gleichmäßige *Dll*-Aktivität zeigt.

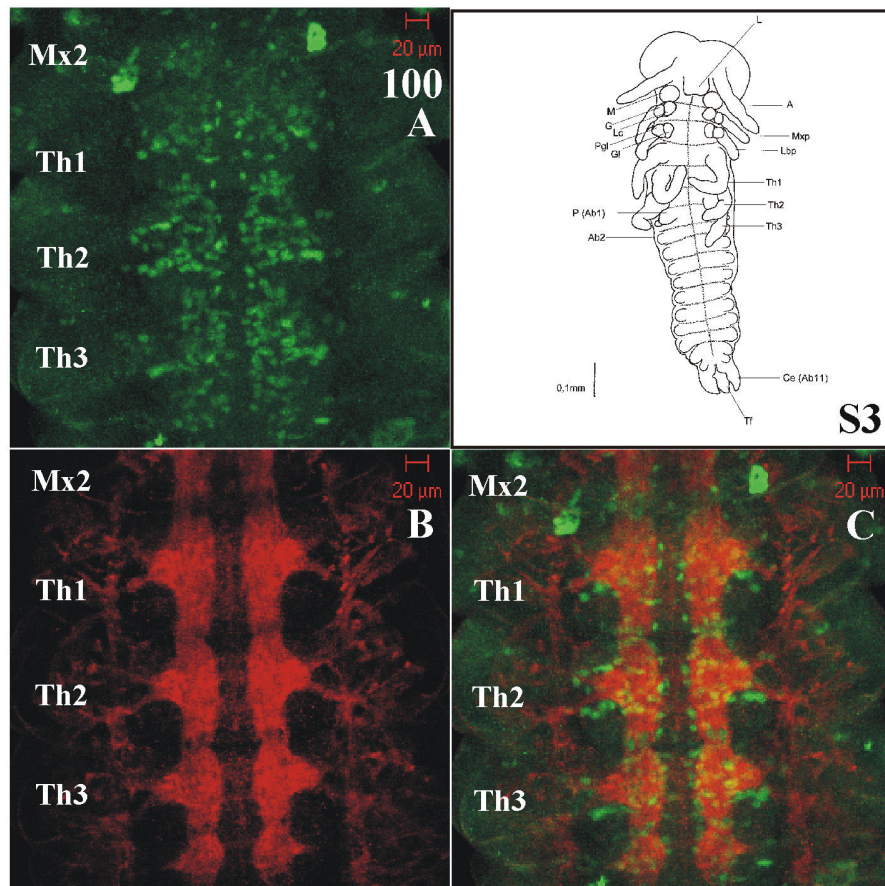


Abb. 100 *Lepisma saccharina*, ZNS (S3/S4; *Dll*-grün/Synorfl-rot). Die gesamten ZNS-Konnektive und die Ganglien mit den austretenden Axonen sind massiv von *Dll*-positiven Zellen umgeben. Mx = Maxille; Th = Thoraxextremität.

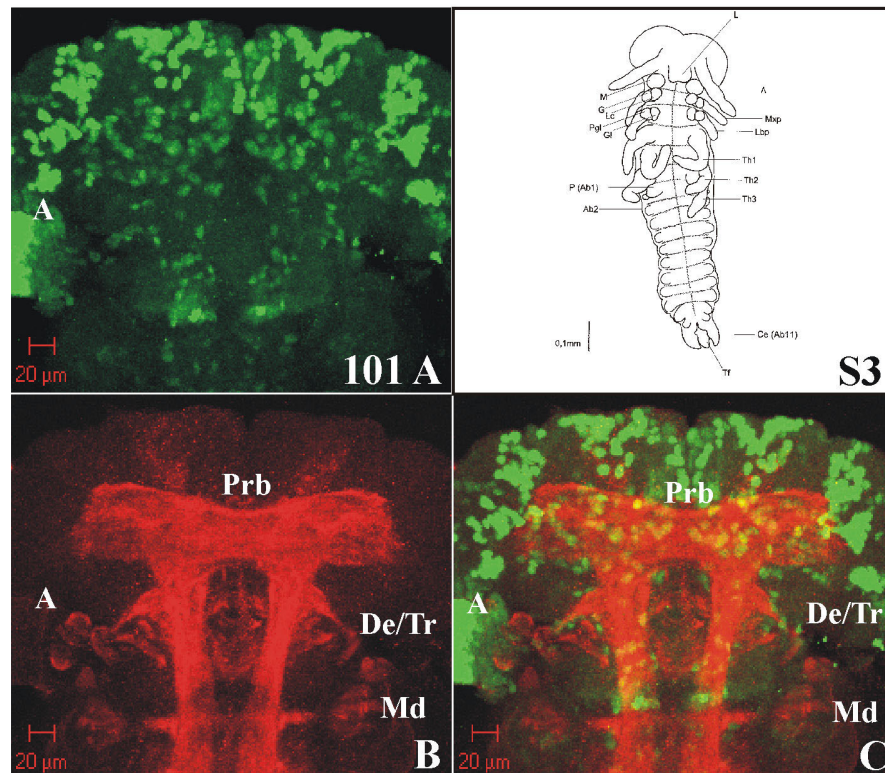


Abb. 101 *Lepisma saccharina*, ZNS im Kopf (S3/S4; *Dll*-grün/Synorfl-rot). Auch im Kopf finden sich zahlreiche *Dll* exprimierende Zellen. Das gesamte Kopfneuropil wird von *Dll*-positiven Zellen umhüllt, aber es finden sich auch etliche *Dll* exprimierende Zellen in den Randbereichen, wo kein eindeutiger Zusammenhang mit Neuropil zu erkennen ist. A = Antenne; De/Tr = Deuto-/Tritocerebrum; Md = Mandibel; Prb = Protocerebralbrücke.

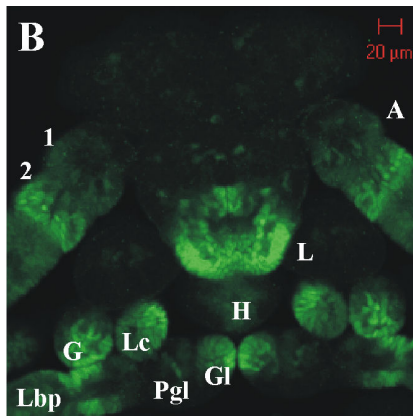
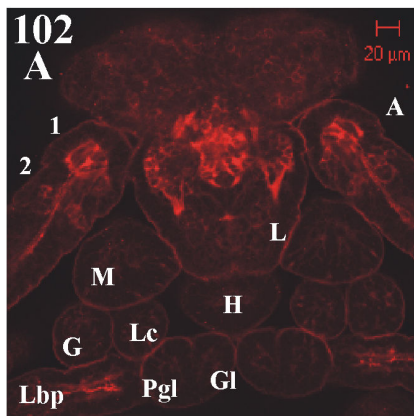
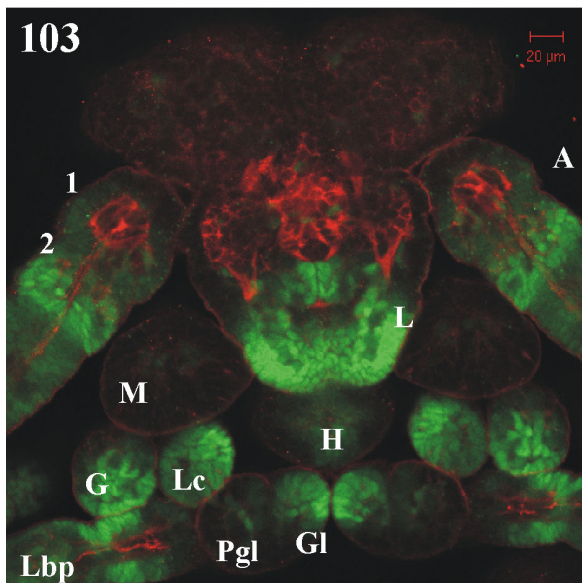
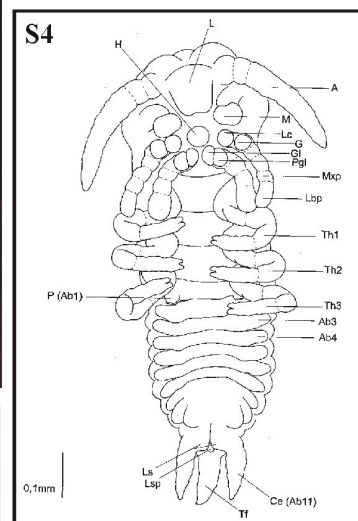
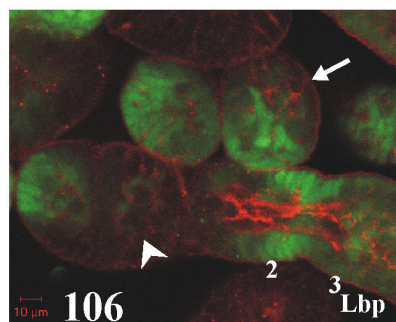
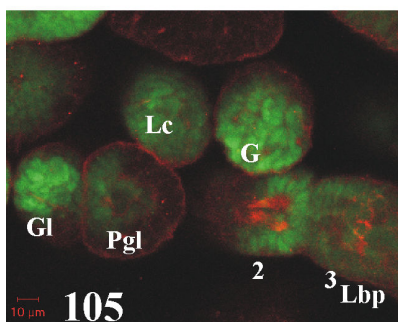
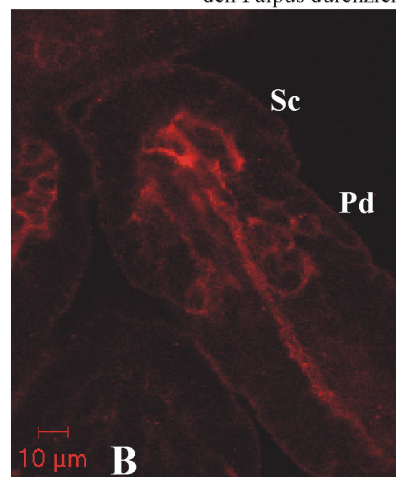
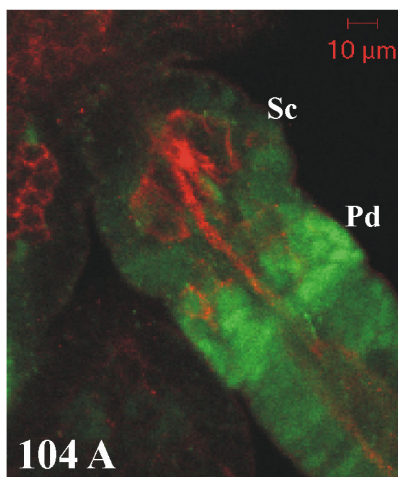


Abb. 102/103 *Lepisma saccharina*, ZNS im Kopf (S4; *Dll*-grün/*Synorfl*-rot). Fokussiert man im S4-Stadium durch den Kopf des Silberfischchens hindurch, stößt man im gesamten Kopfneuropil auf *Dll*-positive Zellen, die sich an Axone und Nervenfasern anlagern. Deutlich ist der massive Nervenstrang zu sehen, der vom Deutocerebrum in die Antenne (A) zieht. Im 1. und 2. Antennensegment (1, 2) sieht man sowohl die starken Nervenplechte, als auch die unterschiedlich starke *Dll*-Expression. Das Labrum (L) zeigt an seiner distalen Spitze



eine ausgeprägte *Dll*-Expression, und man sieht starke Nervenfasern hineinziehen. G = Galea; Gl = Glossa; H = Hypopharynx; Lc = Lacinia; Lbp = Labialpalpus; M = Mandibel; Pgl = Paraglossa. **Abb. 104** *Lepisma saccharina*, Antenne (S4; *Dll*-grün/*Synorfl*-rot). Ein massiver Nervenstrang zieht durch die gesamte Antenne; immer wieder findet man beim Fokussieren *Dll*-positive Zellen angelagert. Im Scapus (Sc), dem ersten Segment, findet sich tief im Innern des Gliedes ein umfangreiches Nervenplechte; die Nervenzellen oder ihre Axone reichen nicht bis zur Antennenwand. Im Pedicellus (Pd), befindet sich das Johnstonsche Organ. Deutlich sieht man wandständige Nervenzellen. In diesem Segment ist die *Dll*-Expression besonders ausgeprägt.

Abb. 105/106 *Lepisma saccharina*, Maxillen in verschiedener Focusebene (S4; *Dll*-grün/*Synorfl*-rot). Auch unterhalb der ausgeprägten *Dll*-Expression in den Maxillen findet man Nervenplechte. In Lacinia (Lc) und Galea (G) liegen kleinere Nervenplechte (Pfeil), und es scheint, als ob an der Oberfläche offene Nervenendigungen sein könnten. Eine entsprechende Situation liegt für Glossa (Gl) und Paraglossa (Pgl) vor (Pfeilspitze). Im Labialpalpus (Lbp) findet man neben einem massiven Nervenstrang, der den Palpus durchzieht, ein stärkeres Nervenplechte im Bereich des 2. und 3. Gliedes, einem Bereich, in dem auch eine ausgeprägte *Dll*-Expression zu finden ist.



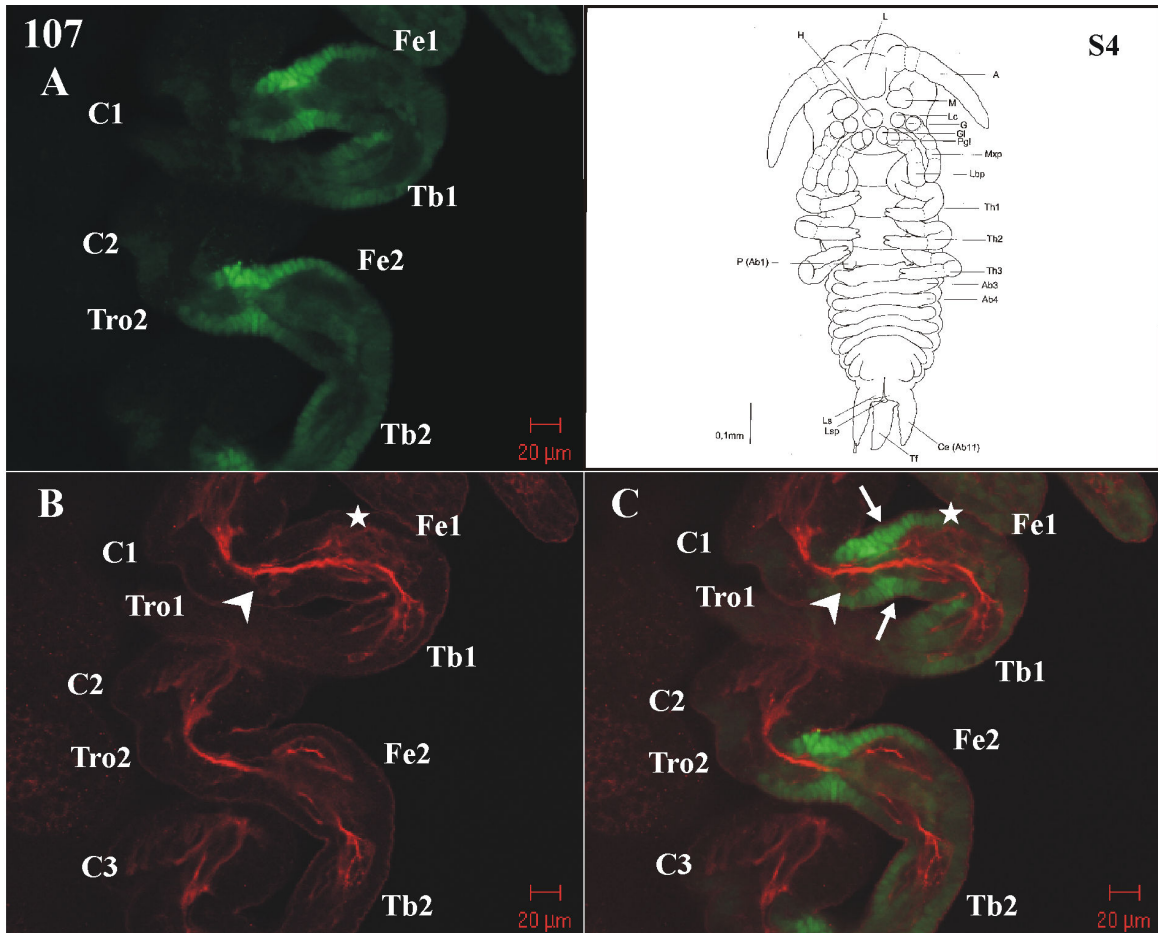


Abb. 107 *Lepisma saccharina*, Thoraxbeine (S4; *Dll*-grün/*Synorfl*-rot). Ein ganz ähnliches Bild wie in den Maxillarpalpen oder der Antenne finden wir auch in den Thoraxbeinen. Ein ausgeprägter Nervenstrang durchzieht das gesamte Bein. Man kann ein weitläufigeres Fasergeflecht in der Coxa (C) erkennen, im Trochanter (Tro) beschränkt sich die Innervierung wieder auf einen Strang, um dann jedoch im Übergang zum Femur in ein kleineres, kompakteres Nervengeflecht überzugehen (Pfeilspitze). Im distalen Femur (Fe) liegt ein weiteres, netzartiges Nervengeflecht vor (★). In diesem Bereich, d.h. beim Gelenk zwischen Trochanter und der ersten Femurhälfte, ist die *Dll*-Expression am massivsten (Pfeil, siehe auch Abb. 108). Hinter dem Femur ist das Nervennetz wieder weniger ausgeprägt, um sich in der Tibia (Tb) wieder auszudehnen. Im Bereich zwischen Femur und Tibia läßt die *Dll*-Expression nach, wird jedoch in der Tibia nochmals stärker. Auffallend ist die Ähnlichkeit dieser netzförmigen Nervengeflechte mit dem Johnstonschen Organ in der Antenne (Chordotonalorgan).

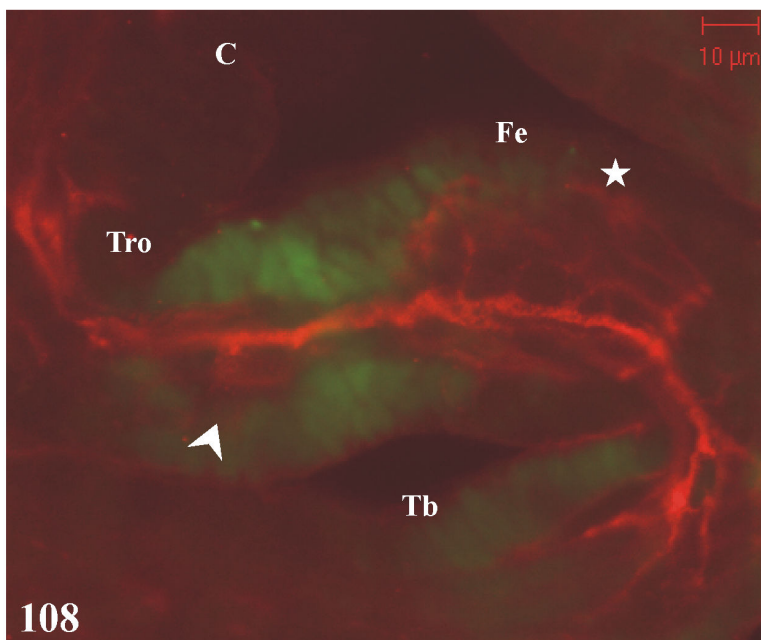


Abb. 108 *Lepisma saccharina*, Ausschnitt Thoraxbein (S4; *Dll*-grün/*Synorfl*-rot). Eine Ausschnittsvergrößerung zeigt nochmals den Verlauf der Nervenfasern in den Thoraxbeinen. Der von der Coxa (C) kommende Strang läuft im Übergang Femur/Trochanter in ein kompaktes Nervengeflecht aus (▶), wird dann wieder kurzfristig einsträngig, um ein weitläufigeres, luftigeres Nervengeflecht im Femur (Fe) zu passieren (★). Daraufhin verzweigt er sich wieder in der Tibia. Die ausgeprägteste *Dll*-Expression finden wir zwischen den zwei Fasergeflechten, d.h. in der Nähe des Gelenkes Trochanter (Tro)/Femur.

IV. DISKUSSION

IV.1 DIE FRÜHE NEUROGENESE

Insgesamt verläuft die Neurogenese bei *Limulus polyphemus* sehr ähnlich wie bei *Cupiennius salei* und *Pholcus phalangioides* (Stollewerk *et al.*, 2001, 2003), dennoch lassen sich einige Unterschiede feststellen, die eher ältere Literaturdaten zu bestätigen scheinen.

Zuerst möchte ich jedoch eine begriffliche Klärung voranstellen. Im Gegensatz zu Stollewerk *et al.* (2001, 2003) bevorzuge ich als Charakterisierung für die dorsale Zellbewegung aus der ventralsten Neuroektodermis die Begriffe „Immigration“ an Stelle von „Invagination“. Begriffe wie Immigration, Invagination, Delamination, Ablation etc. werden im allgemeinen mit Gastrulationsvorgängen assoziiert (siehe beispielsweise Schwartz, 1973). Unter Invagination versteht man gewöhnlicherweise eine Einstülpung einer Zellgruppe, die in den meisten Fällen zur Ausbildung eines Hohlraumes oder einer Art Höhle führt. Die Verwendung des Begriffs für die Bewegung einzelner Zellen ist zumindest ungewöhnlich. Eine Delamination hingegen beschreibt normalerweise eine Einwärtsbewegung von Zellen oder Zellschichten nach oder im Zusammenhang mit einer radialen Proliferation (Brauer, 1895; Schwartz, 1973). Bei *Limulus polyphemus* konnte eine solche Korrelation nicht festgestellt werden. Aus diesem Grunde ziehe ich den Begriff „Immigration“ vor. Unter Immigration versteht man eine einwärts gerichtete Zellbewegung, bei der sich einzelne Zellen aus einem Gewebe oder Zellcluster lösen. Die frühe Neurogenese von *Limulus polyphemus*, bei der einzelne Zellen die ventralste Neuroektodermis respektive das Cluster flaschenförmiger Zellen dorsad ins Innere des Embryos verlassen, scheint am ehesten diesem Vorgang zu entsprechen. Generell wird angenommen, daß der Immigrationsmodus der Gastrulation eine evolutionär bedingte Modifikation des Invaginationsmodus ist (Schwartz, 1973). Entsprechendes vermutet Richter (2002) hinsichtlich der Delamination, die wir bei *Drosophila melanogaster* vorfinden.

Die Beobachtungen, die Patten (1889, 1890, 1893, 1912) und Kingsley (1893) bei der Untersuchung der Pfeilschwanzkrebsneurogenese anstellten, waren insbesondere in Anbetracht der damals vorhandenen technischen Möglichkeiten äußerst exakt. Tatsächlich kann man bei *Limulus polyphemus* mit fortschreitender Neurogenese die Spots der ventral gelegenen Zellfortsatzbündel unter einem normalen Mikroskop und ohne spezifische Färbung sehen. Bei Embryonen, die mit der Kernfärbung Hoechst (Bisbenzimid) markiert wurden, sind die Spots noch deutlicher sichtbar (Abb. 61) Diese Spots wurden gelegentlich als „Gruben“ beschrieben, und tatsächlich sehen sie in unmarkierten Embryonen auch so aus, da die gebündelten Zellfortsätze der flaschenförmigen Zellen nicht sichtbar sind; man erkennt erst wieder die tiefer im Embryo gelegenen Zellkörper respektive die Kerne. Ebenfalls mit einfachen optischen Methoden zu sehen sind die hemisegmentalen Verdickungen, die durch die Konzentration der neurogenen Zellcluster zustande kommen. Ohne Laser Scanning Microscope (LSM) ist es jedoch schwierig, die Zellform der kleinen

Zellen (ca. 5-10 μm) von *Limulus polyphemus* oder gar ihr Teilungsmuster auszumachen. So mußte sich Kingsley (1893) auf die Beschreibung beschränken, daß das ZNS der Pfeilschwanzkrebse sich aus mehreren, regelmäßig angeordneten Zellclustern entwickelt, die sich auf irgendeine Weise ins Innere des Embryos bewegen und sich in paarigen segmentalen Strukturen konzentrieren. Im Gegensatz zu Patten (1889, 1890), der diese Strukturen als „Sinnesorgane“ deutete, hielt Kingsley (1893) sie für Zentren rascher Proliferation von Nervenzellen. Weitere Schlüsse ließen seine Beobachtungsmöglichkeiten nicht zu. Obwohl ungefähr 80 Jahre später, konnte Anderson (1973) keine wesentlich neueren Daten zusammenfassen und vermutete, daß die neuroektodermalen Zellen nach innen gerichtete Teilungen vornehmen und sich die Zellen ebenfalls in paarigen segmentalen Verdickungen konzentrieren.

Die Untersuchungen an *Limulus polyphemus* mittels verschiedener Marker und des LSMs zeigen, daß die „Gruben“ aus Zellclustern bestehen, die sich aus flaschenförmigen Zellen zusammensetzen. An der ventralen Oberfläche verbleiben nur gebündelte Zellfortsätze, während die Kerne sich dorsad nach innen verlagern. Diese Zellen sind etwas größer als die des umgebenden Epithels. Teils sind diese flaschenförmigen Zellen direkt an der Neuropilbildung beteiligt, teils lösen sie sich erst vom ventralen Neuroektoderm, verbleiben aber in dem Cluster und bilden dann Neuropil aus. Nach Lösung aus dem Cluster nehmen die Zellen wieder eine rundlichere Form ein. Die Zellen dieser Cluster teilen sich selten, die meisten Proliferationen findet man in der ventralsten Neuroektodermis. Sie sind fast ausschließlich horizontal orientiert, wie die PH-3-Markierungen zeigen. Ein festes Teilungsmuster, wie wir es von Neuroblasten kennen, konnte nicht festgestellt werden. Bevor sich alle Immigrationszentren gebildet haben, beginnen flaschenförmige und immigrierte Zellen bereits mit der Neuropilbildung. Die Zellcluster eines Hemisegmentes beginnen sich zentral zu konzentrieren und das Neuropil zu vereinigen. Nun setzt auch die Axogenese ein, erste Pionieraxone der longitudinalen Konnektive durchziehen den Embryo; schnell gesellen sich weitere dazu. Auch die Kommissuren bilden sich. Die weitere Axogenese vollzieht sich sehr rasch. Bei *Limulus polyphemus* werden im Gegensatz zu verschiedenen anderen Cheliceraten keine Ganglionhöhlen abgeschnürt.

Vergleichen wir nun diese Daten mit den Beschreibungen der Neurogenese weiterer Cheliceratenvertreter. Brauer (1895) fand beim Skorpion (Scorpiones) *Euscorpius carpathicus* „eigentümliche kleine Grübchen in großer Zahl auf allen Ganglienanlagen“. „Die Gruben sind von großen Zellen mit großen rundlichen Kernen gebildet, sie sind wallartig umschlossen von kleinen spindelförmigen Zellen mit kleinen langgestreckten Kernen. Auch bei der Anlage des Gehirns trifft man auf diese Grübchen.“ Vergleicht man diese Beschreibung mit dem Muster von *Limulus polyphemus*, so erinnert sie an die Zellcluster aus flaschenförmigen (spindelförmigen) Zellen, in deren Mitte schon einige Zellen immigriert sind, d.h. sich vom ventralsten Neuroektoderm gelöst haben und wiederum eine rundlichere Form eingenommen haben. Brauer (1895) beschreibt weiter, daß die Bildung der Fasersubstanz auf der inneren Seite beginnt, bevor sich das Nervensystem von der ventralen Oberfläche ablöst. Hierin stimmt das Muster von *Euscorpius carpathicus* mit dem von *Limulus polyphemus* überein. Darüber hinaus findet man bei beiden Organismen einen ap-Gradienten während der Axogenese. Brauer (1895)

spezifiziert diesen nicht genauer, bei *Limulus* ist er deutlich zwischen Prosoma und Opisthosoma vorhanden sowie innerhalb des Opisthosomas. Eine Variabilität zeigt sich hinsichtlich der Axogenese: Bei *Euscorpius* bilden sich zuerst die Längskonnektive, dann die Querkommissuren, wogegen bei *Limulus* Konnektive und Kommissuren offenbar fast gleichzeitig entwickelt werden.

Für den Geißelskorpion (Uropygi) *Telyphonus caudatus* beschreibt Kästner (1951) ebenfalls, daß die Neurogenese erst im Stadium der ausknospenden Extremitätenanlagen beginnt. Weiterhin findet er „mehrere Stellen des Segmentes, an denen sich die Kerne von der Oberfläche des Epithels zurückziehen, so daß ein distal gelegener kernfreier Plasmaraum von der Form einer Halbkugel entsteht.“ Über diesen Gruben finden sich in diesem frühen Stadium 2 bis 3 Zellschichten. Diese Beschreibung entspricht der Situation bei *Euscorpius* und erinnert wiederum sehr an die Muster der Zellcluster flaschenförmiger Zellen bei *Limulus polyphemus*. Kästner (1951) vermutet, daß die Gruben letztendlich darauf zurückgehen, daß sich die Zellen des ventralen Neuroektoderms in horizontale Richtung teilen und aufgrund von Platzproblemen ins Innere des Embryos ausweiten. Kästner beschreibt nicht, ob er horizontale Zellteilungen beobachtet hat, wir wissen jedoch von *Limulus* und *Cupiennius*, daß weitgehend alle Proliferationen im ventralen Neuroektoderm in horizontale Richtung erfolgen. In einem späteren Stadium nimmt die Anzahl der Kernrückzüge zu. Darüber hinaus findet Kästner (1951) „stark gefärbte Stränge ganz dicht aneinanderliegender Kerne, die sich von der Oberfläche senkrecht ins Innere des Neuomers bis zu dessen Innenwand ziehen“. Oft sind diese noch stark in Wuchsrichtung gestreckt (Kästner, 1951); im Verlauf der weiteren Entwicklung nimmt die Zahl der „strangartig nach innen einwachsenden Kernreihen“ stark zu. Plasmastränge ziehen ventrad zur Oberfläche; das Ektoderm beginnt sich zu lösen. Wenig später sind die Plasmastränge verschwunden, eine Ektodermischiebt sich über die gesamte Nervenmasse und versenkt sie so ins Innere. In den Extremitätenganglien haben die mittlerweile 11 bis 12 Kernschichten dorsal eine dünne Neuropilemschicht gebildet, die Konnektiv- und Kommissurentwicklung hat begonnen. Auf der Ventralseite des Ganglions bildet sich ein Hohlraum, der durch die zusammenwachsenden Ränder zur Ganglionhöhle wird. Auch bei *Thelyphonus caudatus* zeigt sich zumindest im Opisthosoma ein deutlicher ap-Gradient während der Neurogenese respektive der Axogenese.

Weygoldt (1975) beschreibt für die Geißelspinne (Amblypygi) *Tarantula marginemaculata* segmentale Ganglienanlagen mit zahlreichen Neuroblasten, die sich rasch teilen. Die Neuroblasten, die nicht größer sind als die sie umgebenden Zellen, bilden durch Proliferationen Zellkomplexe, die sich schlauchartig einstülpen. Wiederum finden die meisten Teilungen im basalen Bereich des ventralen Neuroektoderms statt; auch während des Einstülpungsvorganges verharren die Neuroblasten an der Basis (Weygoldt, 1975, 1985). Sie setzen die Proliferationen auch dann noch weiter fort, wenn sich die Zellen an der Spitze der Einstülpungen bereits in Neurone und Axone differenzieren (Weygoldt, 1975, 1985). Es entsteht somit an der Dorsalseite der Ganglienanlage bereits Neuropil, während von ventral immer neue Zellen gebildet werden. In diesem zeitlichen Ablauf ergibt sich wiederum eine Übereinstimmung mit *Limulus polyphemus*, bei dem auch bereits Neuropil gebildet wird, bevor sich alle Immigrationszentren gebildet haben. Bei *Cupiennius salei* gibt es diesen graduellen Modus anscheinend nicht, das Neuropil

entwickelt sich erst, wenn alle Immigrationszentren ausgebildet sind und sich mit einmal dorsad bewegt haben (Stollewerk *et al.*, 2001). Die einzelnen Proliferationen der Amblypygi bilden keine Einstülpungen; die Zellen bleiben während der Proliferation durch plasmatische Fortsätze mit der Oberfläche verbunden. Das Ganglion wird zwar später durch seitliche Epidermisüberwachsungen nach innen verlagert, große Ganglionhöhlen werden wie bei Xiphosuren nicht ausgebildet.

Weygoldt (1975) bezeichnet die neurogenen Zellen als Neuroblasten, ohne genauer auf ein spezifisches Proliferationsmuster, wie es für Hexapoda und Crustacea nachgewiesen wurde, einzugehen. Somit ist nicht klar, ob er mit „Neuroblasten“ proliferierende neurogene Zellen bezeichnet oder tatsächlich homologe Bildungen zu den Neuroblasten der Hexapoda und/oder Crustacea meint. Da sowohl bei *Limulus* als auch *Cupiennius* (Stollewerk *et al.*, 2001) keine Korrelation zwischen den Zellteilungen und der Einwärtsbewegung neurogener Zellen festgestellt wurde, bezeichne ich diese Zellen nicht als Neuroblasten, um begrifflichen Unschärfen vorzubeugen.

Bei Pseudoskorpionen findet Weygoldt (1965, 1985) paarige segmentale Einstülpungen, die sich zu umfangreichen Ganglionhöhlen entwickeln. Diese Invaginationen trennen sich von der Epidermis ab. Die Dicke der nach innen gerichteten Wände nimmt durch zahlreiche Proliferationen zu. Dennoch wird die Ganglionhöhle immer kleiner und verschwindet irgendwann vollständig. Zeitgleich differenzieren sich die obersten Zellen in Neurone und bilden Dendriten aus. Die Axogenese der Konnektive und Kommissuren setzt ein (Weygoldt, 1985).

Pross (1966) beschreibt für die Webspinne (Araneae) *Pardosa hortensis* segmentale grubenähnliche Bildungen, die kreisförmig von Kernen umgeben sind. Diese Gruben entstehen wiederum durch Zurückziehen von Kernen von der Oberfläche, wodurch sich ein kernfreier Raum bildet. Im Mittelpunkt dieser Gruben sitzt tiefer als alle anderen Zellen ein großer „Neuroblast“. Die „Neuroblasten“ in den Gruben teilen sich mehrfach, wodurch strangartig nach innen einwachsende Reihen kleiner runder Nervenzellen entstehen. Allerdings können sich diese „Neuroblasten“ auch horizontal teilen, sie bewegen sich aber wegen der dadurch entstehenden Zellen aufgrund von Platzmangel ins Innere des Embryos (Pross, 1966). Durch die Beschreibung der multiplen Teilungen, die strangartige Reihen kleiner runder Nervenzellen hervorbringen, scheint es sich bei den als „Neuroblasten“ beschriebenen Zellen um „gewöhnliche“ neurogene Zellen zu handeln, die nicht dem definierten Neuroblastenproliferationsmodus von Crustacea und Hexapoda entsprechen.

Wegen ihrer zahlreichen ursprünglichen Merkmale sind die Pantopoda ein hochinteressantes Objekt für vergleichende Studien. Winter (1980) findet bei dem Pantopoden *Callipallene emaciata* sogenannte Ventralorgane, die er als „paarige ektodermale Einstülpungen von Neuroblasten mit metamerem Charakter“ definiert. Generell zeigt die Pantopodenneurogenese einen ausgeprägten ap-Gradienten. Die Neurogenese setzt mit der Stomodaeumeinstülpung ein, einem Stadium, in dem die ersten Extremitäten ausknospen. 2 bis 5 spindelförmige Neuroblasten ragen weit ins Körperinnere. Die Kerne liegen in der inneren Zellspitze und zeigen oft radiale Spindelstellung. Die durch Neuroblastenproliferation hervorgegangenen Zellen liegen in radialen Reihen. Bis zu 20 Neuroblasten können sich auf engstem Raum differenzieren; dadurch wird das „Ventralorgan“ ins Innere gedrückt. Die Neuomere vergrößern sich in

radialer und tangentialer Richtung. Bei Pantopoden scheint die Neuropilbildung erst zu beginnen, wenn die Ventralorgane von der Oberfläche getrennt sind. Im Verlauf der weiteren Entwicklung atrophieren die „Ventralorgane“. „Ventralorgane“ scheinen nur im ventralen Keimstreif vorzukommen, nicht jedoch im Kopflappen (alles: Winter, 1980). Anhand dieser Beschreibung und Winters (1980) Abbildungen kann man nicht entscheiden, ob es sich um einen eventuell leicht modifizierten Neuroblastenmodus gemäß obiger Definition handelt; hier wären weitere Untersuchungen zum Zellteilungsmuster sehr zu begrüßen.

Die genannten „Ventralorgane“ oder auch „Gangliengruben“ finden sich noch bei etlichen Arthropoden und Protarthropoden: bei Onychophoren (Kennel, 1885; Pflugfelder, 1948; Eriksson *et al.*, 2003), bei Symphylen in Form von *Hanseniella spec.* (Tiegs, 1940), bei *Paupopus* als Pauropodenvertreter (Tiegs, 1947) und beim Diplopoden *Glomeris* (Dohle, 1964; Dove & Stollewerk, 2003). Vergleicht man nun die aufgeführten Beschreibungen, kann man cheliceratenspezifische Merkmale finden, von denen zumindest einige zum Grundmuster der Chelicerata gehören:

1. Die sichtbare Neurogenese scheint bei allen Chelicerata erst einzusetzen, wenn zumindest die prosomalen Extremitäten auszuknospen beginnen.
2. Bei allen untersuchten Cheliceratenvertretern beginnt die Neurogenese über Proliferationen von multiplen, segmentalen Zellgruppen im Ektoderm.
3. Bei allen bislang untersuchten Cheliceratenvertretern finden die meisten (bei einigen sogar alle) neurogenen Proliferationen im basalsten Bereich des Neuroektoderms statt.
4. Bei allen Cheliceratenvertretern findet man eine Kernbewegung ins Innere, wodurch sich eine Art „Grube“ – in einigen Fällen nur eine „optische Grube“ – ergibt.
5. Bei allen Cheliceratenvertretern findet man Zellen, die spindel- oder flaschenförmig ins Innere ragen; ihre Kerne liegen am dorsalsten Ende der Zelle.
6. Alle Cheliceratenvertreter zeigen einen ap-Gradienten während der Axogenese zumindest im Opisthosoma, häufig verläuft auch die ganze Neurogenese graduell von anterior nach posterior.
7. Bei allen Cheliceratenvertretern findet man überwiegend horizontale Teilungen der neurogenen Zellen im ventralsten Neuroektoderm, bei einigen finden zusätzlich radiale Teilungen statt, bei anderen ausschließlich horizontale.

Variables Merkmal der Cheliceratenneurogenese ist unter anderem die Ausbildung tiefer Ganglionhöhlen, wie wir sie bei Uropygi, Pseudoskorpiones und Pantopoda finden, wohingegen beispielsweise Xiphosuren, Amblypygi, Scorpiones und Araneae keine Ganglionhöhlen entwickeln.

Insgesamt scheinen bei Cheliceraten keine Neuroblasten im Crustacea- und Hexapoda-Sinne vorzukommen. Die vorliegenden Daten von *Limulus polyphemus* (Mittmann, 2002), von *Cupiennius salei* und *Pholcus phalangioides* (Stollewerk *et al.*, 2001, 2003) bestätigen die Annahme von Chaboud *et al.* (1990), daß bei Cheliceraten keine Neuroblasten ausgebildet werden. Somit konnte über *Limulus polyphemus* ein weiterer Hinweis darauf

geliefert werden, daß Neuroblasten aller Wahrscheinlichkeit nach innerhalb des Mandibulatenzweiges evoluiert wurden. Die Proliferation der neurogenen Zellen zeigen kein spezifisches Muster, sondern nur vielfältige Teilungen.

In verschiedenen Beiträgen über die „Tetraconata“ (unter anderem: Dohle, 1997, 1998, 2001; zusammengefaßt bei Richter, 2002) wurde mit unterschiedlichem Ergebnis die Frage diskutiert, ob die Neuroblasten von Hexapoden und zumindest von Malakostraken und Anostraken homolog sind. In diesem Zusammenhang bedauert Harzsch (2001), daß kein Außengruppenvergleich mittels der Chelicerata mit zellteilungsspezifischen Markern vorgenommen wurde. Teilweise wurde diese Lücke durch die PH-3-Expressionsmuster bei *Cupiennius salei* (Stollewerk *et al.*, 2001) und die Daten der vorliegenden Arbeit ausgefüllt – und es konnte kein neuroblastenspezifisches Proliferationsmuster festgestellt werden. Auch für Myriapodenvertreter liegen mittlerweile Ergebnisse vor (Dove & Stollewerk, 2003). Bei *Glomeris marginata* unterscheidet sich das Mitosemuster zu dem der Cheliceratenvertreter insofern, als eine Korrelation zwischen mitotischen Zellen und Invaginationszentren vorhanden ist. Besonders viele Mitosen findet man in den Bereichen, in denen die Invaginationszentren entstehen. Ob die Invaginationszentren auch aus diesen Zellklonen bestehen, konnte bislang nicht festgestellt werden; endgültigen Aufschluß darüber werden Einzelzellmarkierungen erbringen. Nichtsdestotrotz kann bereits jetzt mit einiger Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß kein homologer „stem cell mode“ via Neuroblasten vorliegt.

Da *Limulus polyphemus* ein rezenter Cheliceratenvertreter mit zahlreichen ursprünglichen Merkmalen ist - insbesondere in der Embryonalentwicklung zeigt er laut Anderson (1973) die meisten ursprünglichen Merkmale aller Cheliceraten - und etliche Übereinstimmungen mit anderen Cheliceraten gefunden werden konnten, kann man annehmen, daß der vorliegende Neurogenesemodus das ursprüngliche Neurogenesemuster der Chelicerata darstellt (Mittmann, 2002). Betrachtet man nun die Neurogenese der vier großen Arthropodentaxa unter Verwendung des traditionellen Stammbaumes, ergibt sich folgendes Bild (Abb. 109):

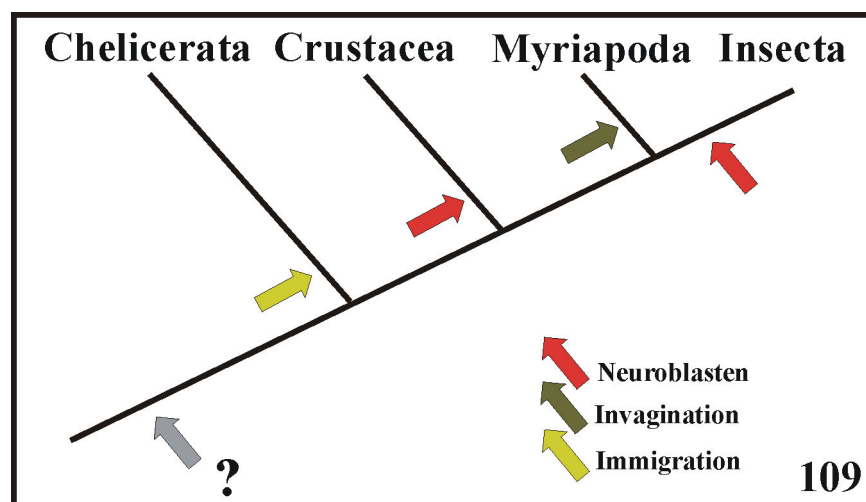


Abb. 109 Die Neurogenesemodi der vier großen Arthropodentaxa (traditioneller Stammbaum).

Nimmt man an, daß die Neuroblasten von Crustaceen und Hexapoden homolog sind, muß dieser Neurogenesemodus zumindest bei den Myriapoda geändert worden sein, denn bei keinem bislang untersuchten Myriapoden konnten Neuroblasten nachgewiesen werden (Dohle, 1964; Dove & Stollewerk, 2003). Statt dessen finden wir einen leicht variablen Invaginationsmodus: Zellcluster eng gepackter Zellen stülpen sich ins Innere des Embryos ein. Laut Dove & Stollewerk (2003) entspricht der Modus bei *Glomeris marginata* wesentlich mehr dem cheliceratentypischen Modus als dem insektentypischen Stammzellenmodus. Es handelt sich offenbar eher um eine Immigration mit anschließender Invagination. Auch bei *Glomeris marginata* finden wir Gruppen neuronaler Vorläuferzellen, die ins Innere des Embryos wandern, und keine Einzelzellen wie bei Hexapoden. Da die Chelicerata als Schwestergruppe zu den Mandibulata keine Neuroblasten ausbilden, müssen diese innerhalb des Mandibulatazweiges entstanden sein, wenn wir nicht annehmen wollen, daß sie noch älter sind und der Modus mehrfach geändert wurde, nämlich bei Cheliceraten und mutmaßlich bei Myriapoden. Setzen wir nun die Existenz der Tetracnata voraus, ergibt sich folgendes Bild (Abb. 110):

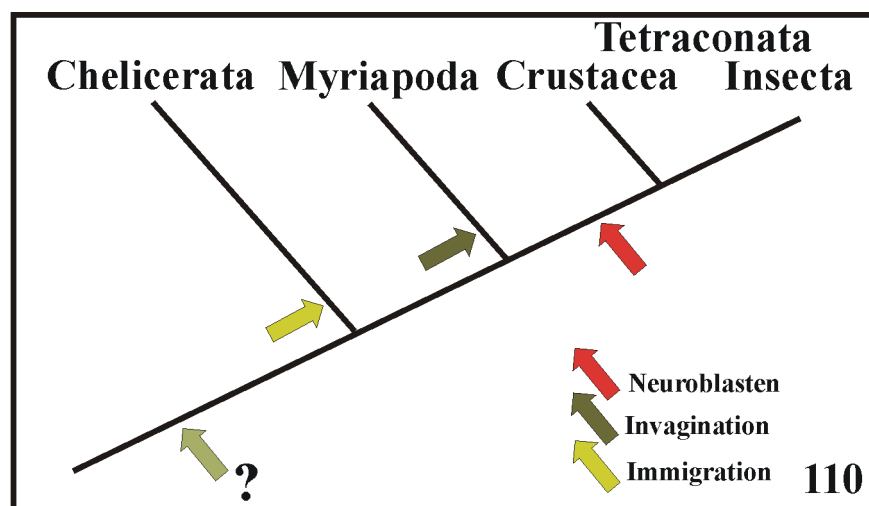


Abb. 110 Die Neurogenesemodi der vier großen Arthropodentaxa (Tetracnata-Stammbaum).

Die homologen Neuroblasten können als apomorphes Merkmal für die Tetracnata gewertet werden, und wir finden den Immigrationsmodus an der Basis der Chelicerata und einen ähnlichen Invaginationsmodus (mit vorangehender Immigration?) an der Basis der Myriapoda (wobei sich der eine Modus leicht aus dem anderen entwickelt haben kann). Somit benötigt dieser zweite Stammbaum einen Schritt weniger, wenn wir nicht annehmen wollen, daß Neuroblasten im ersten Fall (also gemäß der traditionellen Verwandtschaftsverhältnisse) zweimal konvergent entstanden sind.

Stellen wir die sich anschließende Frage nach dem ursprünglichen Neurogenesemodus der Arthropoda, so scheint ein Invaginationsmodus (ob mit vorausgehender Immigration oder nicht) der wahrscheinlichste Kandidat zu sein. Einerseits finden wir Invaginationen bei Myriapoda, die jedoch dem Immigrationsmodus der Cheliceraten sehr ähnlich sind. Ebenfalls einen Invaginationsmodus finden wir bei Onychophora (Eriksson *et al.*, 2003). Zum anderen wird vermutet, daß sich sowohl die Immigration, wie sie bei Cheliceraten

vorliegt, als auch die Delamination, wie wir sie bei *Drosophila melanogaster* und anderen Hexapoden finden, aus einem Invaginationsvorgang entwickelt haben können (Schwartz, 1973; Richter, 2002). Somit gibt es einige Hinweise, daß die Invagination das ursprüngliche Neurogenesemuster der Arthropoden darstellt, wenn es nicht sogar noch weiter zurückreicht.

Die frühe Neurogenese von *Limulus polyphemus*, *Cupiennius salei* und *Pholcus phalangioides* zeigt zahlreiche Übereinstimmungen, die, wie wir im vorhergehenden Abschnitt gesehen haben, teilweise zum Grundmuster der Cheliceraten gehören. Bei allen drei Vertretern finden wir das an einen nächtlichen Sternenhimmel erinnernde Muster der segmental verteilten phalloidinmarkierten Spots. Weiterhin beginnt die Entwicklung der Immigrationszentren in vergleichbaren Embryonalstadien und setzt nie vor dem Auswachsen zumindest prosomaler Extremitäten ein. Bei *Limulus polyphemus* und *Cupiennius salei* finden wir eine korrespondierende Anzahl zuerst beobachtbarer Immigrationszentren: 5 bis 7 bei *Limulus*, 5 bis 8 bei *Cupiennius*. Auch wenn die Entwicklung der Pfeilschwanzkrebseier nicht synchronisiert werden konnte (es wurden bereits befruchtete Eier gesammelt und untersucht; aus diesem Grund mußte die Stadiendefinition (staging) ausschließlich auf morphologische Merkmale beschränkt werden anstelle der exakteren Entwicklungszeit unter Standardbedingungen nach Befruchtung), zeigte sich in der Regel eine ähnliche Zunahme der Anzahl der Immigrationszentren wie bei *Cupiennius salei*. Ob diese Vergrößerung der Zellzentrenanzahl tatsächlich in Wellen erfolgt, wie für *Cupiennius salei* (Stollewerk *et al.*, 2001, 2003) und ebenfalls für *Glomeris marginata* (Dove & Stollewerk, 2003) festgestellt, kann für *Limulus polyphemus* bislang nicht sicher bestätigt werden. Eine solche in zeitlicher Hinsicht wellenförmige Neurogenese wäre in jedem Fall eine Ähnlichkeit zur Neurogenese von *Drosophila melanogaster*. Als Hinweis auf eine vergleichbare wellenförmige Entwicklung bei *Limulus polyphemus* könnte die Häufigkeit gelten, mit der eine bestimmte Anzahl von Immigrationszentren gefunden wurde, die annähernd zu der Anzahl der Zentren in *Cupiennius salei* kongruent ist. Dies bleibt bislang jedoch mit einem Fragezeichen versehen.

Auch die Gesamtzahl von ca. 30 Immigrationszentren pro Hemisegment korrespondiert zwischen allen drei untersuchten Cheliceratenvertretern. Darüber hinaus entspricht sich ebenfalls weitgehend die Organisation dieser Zentren in transversale und longitudinale Reihen. Bei den beiden Vertretern der Araneae finden wir die Immigrationszentren in ungefähr 7 Reihen und 4 Säulen organisiert, bei *Limulus polyphemus* sind es 5-6 transversale Reihen, die in 4-5 longitudinalen Säulen angelegt sind. In dieser Hinsicht existieren nicht nur Übereinstimmungen unter den Cheliceratenvertretern, sondern ebenfalls verblüffende Ähnlichkeiten mit weiteren Arthropodenvertretern, insbesondere Crustaceen und Hexapoden. Beispielsweise entwickelt *Cherax destructor* 25 bis 30 Neuroblasten pro Hemisegment, die in 4-5 Querreihen und 6-7 longitudinalen Säulen organisiert sind (Scholtz, 1992). Harzsch (2001) findet bei *Palaemonetes argentinus* 14 bis 18 Neuroblasten pro Hemisegment, die in fünf Querreihen angeordnet sind. Die genaue Anzahl der Neuroblasten verschiedener Arthropodenvertreter ist jedoch mit einer gewissen Vorsicht zu betrachten, da bei mehreren Arten festgestellt wurde, daß in späteren Embryonalstadien die Anzahl der Neuroblasten abnimmt (*Cherax destructor*: Sullivan &

MacMillan, 2001; *Hyas araneus*: Harzsch & Dawirs, 1994; Harzsch *et al.*, 1998). Harzsch (2001) leitete daraus ab, daß ein Vergleich der Neuroblastenanzahl zu keinem Ergebnis führt. Diese Skepsis ist berechtigt, wenn man nicht sicher sein kann, die Neurogenese durch die Untersuchung zahlreicher verschiedener Entwicklungsstadien so weit abgedeckt zu haben, daß man die maximale Anzahl von Neuroblasten ermitteln kann, bevor sie wieder reduziert werden. Auch bei *Limulus polyphemus* und *Cupiennius salei* werden die Spots aus den ventralen Fortsätzen dünner, sobald die Zellen mit der dorsalen Immigration begonnen haben, und verschwinden bald darauf vollständig. Betrachten wir noch Vertreter der Hexapoda und der Myriapoda: Bei *Drosophila melanogaster* finden sich 25 Neuroblasten pro Hemisegment, die im Verlauf von fünf Wellen gebildet werden und eine feste Position einnehmen. Ihre Anordnung erfolgt während der ersten Wellen in drei longitudinalen Säulen; dieses regelmäßige Muster geht jedoch später aufgrund der Delamination der ersten Neuroblastengeneration verloren (Goodman & Doe, 1993). Bei *Locusta migratoria* werden 30 Neuroblasten pro Hemisegment in einem typischen segmentalen Muster ausgebildet und wiederum in sieben Reihen angeordnet (Bate, 1976). Bei *Schistocerca spec.* findet man hingegen ungefähr 30 Neuroblasten pro Hemisegment (Doe & Goodman, 1985 a,b; Boyan *et al.*, 1993). Und in *Carausius morosus* wurden pro Hemisegment 28 Neuroblasten nachgewiesen, die in sieben Reihen und vier Säulen angeordnet sind (Tamarelle *et al.*, 1985). Auch bei *Carausius morosus* reduziert sich die Anzahl der Neuroblasten in späteren Embryonalstadien (Tamarelle *et al.*, 1985), was dem Vorgang bei verschiedenen Crustaceenvertretern entspricht (Harzsch & Dawirs, 1994; Harzsch *et al.*, 1998; Sullivan & MacMillan, 2001). Hierin zeigt das Muster von *Carausius morosus* durchaus Ähnlichkeit mit demjenigen von *Cherax destructor* (Scholtz, 1992), wobei die Anordnung in 7 Reihen und 4 Säulen den Cheliceraten ähnlicher ist. Bei dem Myriapoden *Glomeris marginata* wurden 30-32 Invaginationszentren gefunden, die in 7 Reihen und 4-5 Säulen angeordnet sind (Dove & Stollewerk, 2003). Für *Ethmostigmus rubripes* finden Whittington *et al.* (1991) über Markierungen mit Anti-HRP im Neuroektoderm ungefähr 30 immunoreaktive Spots; blümchenförmig um diese Spots herum angeordnete Zellen invaginieren ins Innere der Embryos. Angaben über eine genaue Anordnung in Säulen und Reihen fehlen. Zusammengefaßt ergibt sich folgendes Bild (Tabelle 2):

	Neuroblasten/ neurogenetische Zentren pro Hemisegment	Anzahl Reihen	Anzahl Säulen
Chelicerata:			
<i>Cupiennius salei</i>	30	7	4
<i>Pholcus phalangioides</i>	30	7	4
<i>Limulus polyphemus</i>	30	5-6	4-5
Myriapoda :			
<i>Glomeris marginata</i>	30-32	7	4-5
<i>Ethmostigmus rubripes</i>	ca. 30	?	?
Crustacea:			
<i>Cherax destructor</i>	25-30	4	6-7
<i>Palaemonetes argentinus</i>	14-18	5	3
Hexapoda:			
<i>Carausius morosus</i>	28-30	7	4
<i>Locusta migratoria</i>	30	7	4
<i>Drosophila melanogaster</i>	25	?	3 (?)

Tabelle 2. Anzahl der Neuroblasten/neurogenetischen Zentren pro Hemisegment und ihre Anordnung in Reihen und Säulen. Das Fragezeichen bei den Säulen von *Drosophila melanogaster* bezieht sich auf die Tatsache, daß diese Säulenordnung nach der ersten Delaminationswelle verloren geht.

Die Übereinstimmungen hinsichtlich der Anzahl der Neuroblasten respektive der neurogenen Zentren und teils auch ihrer Anordnung sind verblüffend; *Palaemonetes argentinus* paßt jedoch nicht völlig in dieses Bild. Die Untersuchung weiterer Arten aus allen großen Arthropodentaxa wäre wünschenswert.

Ist man sich jedoch der Anzahl der Neuroblasten oder der neuronalen Stammzellen nicht sicher, kann man dennoch versuchen, die Anzahl der daraus entstehenden Neurone abzuschätzen. Denn die Ähnlichkeiten gehen über die Anzahl der Neuroblasten respektive der neurogenen Zentren hinaus; denn auch die entstehende Neuronenanzahl in den abdominalen (Hexapoda, Crustacea) oder den pro- und opisthosomalen Segmenten mit Ausnahme der Cheliceren ist zwischen allen vier Taxa sehr ähnlich, wenn auch Variabilitäten zu vermerken sind. Aus diesem Grunde beziehen sich alle weiteren unkommentierten Zahlen bei *Limulus polyphemus* auf postchelicere Prosomaanhänge.

Bei *Drosophila melanogaster* werden pro abdominalem Hemisegment ca. 320 bis 400 Nervenzellen entwickelt (Hartenstein *et al.*, 1987; Brody, 1996). Bei *Limulus polyphemus* zählen wir ca. 30 Immigrationszentren à durchschnittlich mindestens 8 bis 12 Zellen, was einer Anzahl von 240 bis 360 Nervenzellen pro Hemisegment entspräche. Bei *Procambarus clarkii* als Crustaceenvertreter wurden in den fünf abdominalen Ganglien pro Segment ungefähr 630 Neurone nachgewiesen (Wiersma, 1957; Reichert *et al.*, 1982; Kondoh & Hisada, 1986; Mulloney *et al.*, 2003), was einer Anzahl von ungefähr 315 Neuronen pro Hemisegment entspricht. Dieselbe Neuronenanzahl finden wir auch im sechsten Abdominalsegment (Kondoh & Hisada, 1986), dessen Ganglion ein

Verschmelzungsprodukt aus zwei embryonalen Neuromeren und einem Terminalabschnitt darstellt (Kondoh & Hisada, 1983; Dumont & Wine, 1987; Scholtz, 1995). Über die Neuronenanzahl in den Thoraxsegmenten konnten keine genauen Angaben gefunden werden. Mulloney *et al.* (2003) beschreiben lediglich, daß die annähernd doppelte Größe der Thorakalganglien vor allem einem allometrischen Wachstum des Neuropils im Zusammenhang mit der Laufbeininnervierung geschuldet ist. Bei *Glomeris marginata* finden wir 30-32 Invaginationszentren mit bis zu 11 Zellen, was einer Summe von bis zu 330-352 Neuronen führt (Dove & Stollewerk, 2003). Über Onychophoren als Protarthropodenvertreter liegen bislang keine Ergebnisse vor. Somit finden wir in allen vier großen Arthropodentaxa zwischen 240 und 360 neurogene Zellen pro Hemisegment. Die Differenz kann unterschiedliche Ursachen haben, beispielsweise die Komplexität der Lebensweise (schnell Fliegen versus auf sandigem Meeresboden in trübem Wasser umherzukriechen und darüber hinaus die meiste Zeit eingegraben im Sand zu ruhen) und muß vorerst Spekulation bleiben. Ein Trend in eine bestimmte Richtung ist bislang nicht festzustellen.

Aber allein die Übereinstimmung bei Arthropodenvertretern verschiedener höherer Taxa ist nicht einfach zu verstehen. Eine mögliche Erklärung wäre, daß an der Entwicklung des ZNS der Arthropoden oder sogar auf evolutiv niedrigeren Stufen generell eine bestimmte (Mindest-) Anzahl von neurogenen Zellen beteiligt ist oder sein muß, um ein funktionierendes Strickleiternnervensystem aufzubauen, wegen der Varianz mit einer gewissen Spannbreite. Bei dieser mehr oder weniger konstanten Zahl von neurogenen Zellen zum Aufbau des ZNS sollte es sich aus ökonomischen Überlegungen um eine möglichst geringe Anzahl handeln, gewissermaßen die geringste mögliche Anzahl von Zellen, die nötig ist, um ein funktionsfähiges ZNS aufzubauen. Warum: Mehr Zellen zu produzieren als benötigt, wäre ökonomisch betrachtet in erster Linie teuer. Ohne Notwendigkeit respektive einen ausreichenden Vorteil wird ein hinsichtlich des Aufbaus und der Versorgung so kostenintensives Gewebe wie das Nervensystem nicht entwickelt – die Natur kennt keinen Luxus. Aus diesem Grund kann man einen Trend erwarten, für den Aufbau eines Nervensystems so wenig Zellen wie möglich zu verwenden, allerdings muß die Funktionsfähigkeit sichergestellt sein. Eine solche Mindestanzahl stellt in dieser Überlegung ein ursprüngliches Arthropodenmerkmal dar (wenn es nicht noch erheblich älter ist), die unterschiedlichen weiteren Entwicklungsmodi – Neuroblasten versus Immigrationszentren etc. – hätten sich bei dieser Annahme erst in späteren Evolutionsschritten entwickelt. Diese Überlegung muß im Moment als Spekulation gekennzeichnet werden, Aufschluß darüber können nur Untersuchungen an weiteren Vertretern sowohl der vier großen Arthropodentaxa (einfacher könnte man von „Klassen“ sprechen) als auch der Protarthropodenvertreter wie Onychophoren oder auch Tardigrada liefern. Interessanterweise findet man auch bei Blutegelein eine vergleichbare Anzahl von ungefähr 400 Neuronen pro Hemisegment (Macagno, 1980; Shain *et al.*, 1998). Somit ist die genaue Neuronenanzahl pro Hemisegment in den verschiedensten Arthropodentaxa oder auch Anneliden ein interessantes Feld für weitere vergleichenden Studien, und es ist eine spannende Frage, ob sich hinsichtlich der Unterschiede in den Zellzahlen ein evolutionärere Trend erkennen lässt.

Einige Aspekte der Neurogenese von *Limulus polyphemus* und *Cupiennius salei* sollen noch genauer beleuchtet werden, da bei beiden Vertretern übereinstimmende Untersuchungsmethoden zur Anwendung kamen und sich weitere Ähnlichkeiten feststellen lassen. Beispielsweise kann in beiden Organismen ein eindeutiger anterior-posteriorer Gradient beim Aufbau des ZNS im Opisthosoma beobachtet werden. Für *Cupiennius salei* wurde vermutet, daß dieser zeitliche Entwicklungsunterschied durch die posteriore Angliederung neuer Segmente bedingt ist (Stollewerk *et al.*, 2001). Dies kann für *Limulus polyphemus* nicht zutreffen, da die Segmente respektive der Bereich des Keimstreifs, in dem sie entstehen, bereits in einem früheren Stadium generiert, wenn auch noch nicht spezifiziert wurden. Somit scheint es wahrscheinlicher zu sein, daß die Entwicklung des opisthosomalen Nervensystems bei *Limulus polyphemus* eher mit der Differenzierung der Segmente in Zusammenhang steht.

Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen *Limulus polyphemus* und *Cupiennius salei* besteht in dem raschen Ablauf der Neurogenese. Bei *Cupiennius salei* benötigt die Generierung aller Immigrationszentren ungefähr 3 Tage, und bereits einen Tag später verschwinden die Zentren wieder unter Zurücklassung einer weiteren dorsal gelegenen Schicht aus neurogenen Zellen (Stollewerk *et al.*, 2001). Werden die Eier von *Limulus polyphemus* bei relativ konstanten 25 °C gelagert, verstreichen vom S0-Stadium, in dem die ersten Immigrationszentren auftreten, bis zu dem Stadium, in dem die Zellen mit der Neuropilbildung beginnen, ungefähr 3 Tage. Die Ausbildung der Axone des Strickleiternnervensystems setzt ungefähr einen Tag später ein. Die Axogenese selber erfolgt in beiden Organismen sehr rasch.

Hinsichtlich des zeitlichen Ablaufs der Neurogenese ergeben sich aber auch Unterschiede zwischen *Limulus polyphemus* und *Cupiennius salei*. Beispielsweise beginnt die Neuropilentwicklung bei *Limulus polyphemus* spätestens im S4-Stadium, wahrscheinlich jedoch schon im S3-Stadium, d.h. bevor alle Immigrationszentren ausgebildet sind. Die Neuropilbildung erfolgt demnach graduell. Bei *Cupiennius salei* hingegen beginnen sowohl die Neuropilbildung als auch die Immigration erst, wenn alle Immigrationszentren ausgebildet sind (Stollewerk *et al.*, 2001).

IV.2 KOPFSEGMENTIERUNG

Der anteriore Bereich des embryonalen ZNS von *Limulus polyphemus* ist durch einen circumoesophagealen Neuropilring charakterisiert. Der anteriorste Teil dieses circumoesophagealen Ringes wird durch ausgeprägte Neuropilstränge dominiert, die zu den Lateraläugen und den Medianäugen gehören. Ungefähr auf halber Strecke der circumoesophagealen Konnektive folgt das zweite Neuromer, dessen Kommissur in erster Linie anterior des Oesophagus, also praestomodaeal, verläuft. Nur wenige Fasern verlaufen posterior des Stomodaeums. Von diesem Neuromer werden die Cheliceren innerviert. Nur wenig posterior des Chelicerenneuromers findet sich das nächste Ganglienpaar, das die Pedipalpen innerviert. Seine Kommissur verläuft ausschließlich poststomodaeal und bildet die posteriore Grenze des circumoesophagealen Neuropilringes. Neben den zum ZNS gehörenden Strukturen des circumoesophagealen Ringes finden sich des weiteren Teile des Stomatogastrischen Nervensystems (SNS). Dazu zählen die Stomatogastrischen Ganglien

mit ihrer praestomodaealen Kommissur (der sogenannten Stomodaealbrücke) und einige longitudinale Fasern entlang des sich einstülpenden Stomodaeums, die Kontakt mit den longitudinal verlaufenden ZNS-Konnektiven sowie dem Cheliceren- und Pedipalpenganglion aufnehmen. Vergleicht man nun den anterioren ZNS-Abschnitt von *Limulus polyphemus* mit demjenigen von Crustaceen und Hexapoden, so stößt man auf bemerkenswerte Übereinstimmungen. Bei allen untersuchten Arten ist der circumoesophageale Neuropilring mit den segmentale Strukturen respektive Anhänge innervierenden Nervensträngen ausgesprochen ähnlich angeordnet. Ein unvoreingenommener Vergleich, der Remanes Lagekriterium (Remane, 1956; Remane *et al.*, 1973, 1989) zur Grundlage nimmt, würde mit Sicherheit den circumoesophagealen Nervenring mit den dazugehörigen Nervensträngen von *Limulus polyphemus* und den untersuchten Crustaceen und Hexapoden homologisieren. Der anteriorste Gehirnabschnitt wird sowohl bei *Limulus polyphemus* als auch den Crustaceen und Hexapoden durch Neuropil gebildet, das mit den Augen assoziiert ist. Bei *Limulus polyphemus* folgt daraufhin das Chelicerenganglion, das dem Ganglion der 1. Antenne der Mandibulatenvertreter entspricht. Auch die Innervierung der Chelicere und der 1. Antenne der Crustacea (Sandeman *et al.*, 1992) sowie von *Lepisma saccharina* (eigene Beobachtung) verläuft nach gleichem Muster in ventrale Richtung. Das Pedipalpenneuromer findet seine Entsprechung in den Ganglien der 2. Antenne von *Triops cancriformis* und *Penaeus monodon* (Mittmann & Scholtz, 2003). In diesem Fall verläuft das den jeweiligen Anhang innervierende Neuropil bei allen drei Arten in laterale Richtung. Bei den Hexapoden entspricht dieses Segment dem anhangslosen Interkalarsegment.

Somit gilt festzuhalten, daß wir auch beim Cheliceratenvertreter *Limulus polyphemus* eine Entsprechung zum dreigeteilten Gehirn der Mandibulaten finden, welches sich in Protocerebrum, Deutocerebrum und Tritocerebrum gliedert. Das Chelicerenneuromer wäre somit homolog zum Deutocerebrum der Crustacea und Hexapoda, das zur 1. Antenne gehört. Bei der Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Entwicklung des Gehirns von *Limulus polyphemus* konnte zu keinem Zeitpunkt irgendein Hinweis auf ein zusätzliches Segment zwischen dem Protocerebrum und dem Chelicerenganglion gefunden werden.

Traditionell wird das Chelicerenneuromer mit dem Tritocerebrum gleichgesetzt, d.h. der 2. Antenne respektive dem Interkalarsegment der Mandibulata (u.a. Bullock & Horridge, 1965, pp.822). Betrachten wir nochmals genauer die Argumente, die zu dieser Annahme führen. Neben weiteren Autoren führt Siewing (1963; siehe auch Harzsch & Glötzner, 2002) folgende Punkte auf:

- 1) Die Lage und Wanderung des Chelicerenganglions hinsichtlich des Stomodaeums
- 2) Die postoesophageale Kommissur
- 3) Den Ursprung des anterioren Stomatogastrischen Nervensystems

Mittels der vorliegenden Untersuchungen an *Limulus polyphemus* kann jedoch gezeigt werden, daß diese Argumente keineswegs schlüssig sind:

1) Die Bewegung von Ganglien hinsichtlich ihrer Position zum Stomodaeum wird recht häufig als Argument für die Homologisierung von Kopfsegmenten herangezogen. Auch das Chelicerensegment wurde aufgrund der postoralen Lage seiner Ganglien in frühen Embryonalstadien mit dem 2. Antennensegment/Interkalsegment der Mandibulata homologisiert, deren Ganglien in frühen Stadien ebenfalls eine postorale Position aufweisen (Siewing, 1963; Harzsch & Glötzner, 2002). Dies muß jedoch als sehr schwaches Argument gewertet werden, da alleine schon die Definition eines „frühen Ganglions“ Schwierigkeiten bereitet und immer schwammig festgelegt wird. Erinnern wir uns an die frühen Neurogenesestadien von *Limulus polyphemus*. Würde man das segmentale Nervensystem schon ab dem Auftreten der zahlreichen Immigrationszentren als „frühes Ganglion“ bezeichnen oder erst nach der dorsalen Wanderung und Konzentration der immigrierten Zellen oder auch erst nach der Neuropilbildung? Darüber hinaus finden wir innerhalb der Arthropoden zahlreiche Heterochronien hinsichtlich der Ausbildung des Stomodaeums und der Kopfganglien, was eine zeitliche Gleichsetzung äußerst schwierig, wenn nicht unmöglich macht. Des weiteren gibt es alleine bei Centipeden, Hexapoden und Crustaceen sowohl eine postorale als auch eine parorale Lage des Segmentes der ersten Antenne und seiner Ganglien (Scholtz, 1990; Dohle, 1997; Boyan & Williams, 2002). Aus diesem Grund erscheint es weitaus sinnvoller, Ganglien während der Axogenese zu vergleichen, die ja zum Aufbau des zentralnervösen Strangsystems führt. Dieser Vergleich zeigt eindeutig, daß die Position des sich entwickelnden Ganglions im circumoesophagealen Neuropilring mit derjenigen des (ersten) Antennenganglions der Mandibulata übereinstimmt.

2) Hinsichtlich der Position der Chelicerenkommissur zeigen die Daten von *Limulus polyphemus*, daß der Löwenanteil der Chelicerenkommissur anterior des Stomodaeums verläuft. Somit sind durch die immunhistochemischen Untersuchungen ältere embryologische und neuroanatomische Daten bestätigt, die ebenfalls eine praestomodaeale Chelicerenkommissur beschreiben (Viallanes, 1893; Henry, 1950; Scholl, 1977). Andere Autoren zweifelten wiederum die Existenz einer praestomodaeal verlaufenden Chelicerenkommissur an (Holmgren, 1916; Hanström, 1928; Johansson, 1933). Diese Autoren behaupten, daß die anterior des Stomodaeums verlaufenden Faserbündel, die Verbindung zum Chelicerenganglion haben, die sogenannten Stomodaealbrücke darstellen; diese ist Teil des Stomatogastrischen Nervensystems und innerviert beispielsweise das Labrum. Mittels der α -Tubulin-Färbung bei *Limulus polyphemus* findet man jedoch eindeutig sowohl eine tatsächlich praestomodaeal verlaufende Chelicerenkommissur, zusätzlich jedoch eine Stomodaealbrücke, die ihren Ursprung unabhängig von den Chelicerenganglia in den Stomatogastrischen Ganglien nimmt.

Darüber hinaus sind die Xiphosuren keineswegs die einzigen Cheliceratenvertreter, die eine praestomodaeale Chelicerenkommissur aufweisen. Diese findet man ebenfalls bei Scorpiones, Amblypygi, Uropygi und Solifugae sowie einigen Vertretern der Araneae (Viallanes, 1893; Brauer, 1895; Pappenheim, 1903; Holmgren, 1916; Babu, 1965; Bullock & Horridge, 1965; Weygoldt, 1985).

Eine interessante Ähnlichkeit hinsichtlich der prae- und poststomodaeal verlaufenden Anteile der Chelicerenkommissur wurde kürzlich bei der Untersuchung der

Kommissurenentwicklung bei Hexapoden festgestellt (Boyan *et al.*, 2003). Denn auch wenn das Deutocerebrum bei Hexapoden nicht ausgeprägt ist, sondern zu einem frühen Entwicklungszeitpunkt mit dem Tritocerebrum verschmilzt, kann man die Kommissuren des Deutocerebrums nachweisen (Boyan *et al.*, 2003). Ein Teil dieser Kommissuren verläuft praestomodaeal und vermischt sich mit der Protocerebralbrücke, ein anderer verläuft poststomodaeal, wo er in die Tritocerebralkommissur einfließt (Boyan *et al.*, 2003). Somit verlaufen die Deutocerebralkommissuren der Hexapoden identisch wie die Chelicerenkommissuren bei *Limulus polyphemus* – ein weiteres Argument für die Homologie der beiden Gehirnabschnitte. Boyan *et al.* (2003) leiten aus ihren Daten von *Locusta migratoria* und *Drosophila melanogaster* und den vorliegenden Daten von *Limulus polyphemus* (Mittmann & Scholtz, 2003) die Vermutung ab, daß bei Arthropoden das Stomodaeum direkt durch den deutocerebralen Gehirnteil hindurchwächst und diese Eigenschaft möglicherweise zum Grundmuster der Euarthropoden gehört.

3) Ein weiteres „klassisches“ Argument für die Homologie von Chelicerenneuromer und Tritocerebrum ist die enge räumliche Zusammengehörigkeit und die neuronale Verbindung zwischen den Chelicerenganglien und dem Stomatogastrischen Nervensystem. Bei *Limulus polyphemus* besteht das frühe Stomatogastrische Nervensystem (SNS) aus zwei longitudinalen Nervensträngen, die das invaginierende Stomodaeum begleiten. Diese Längsfasern kann man über weite Strecken verfolgen, sie reichen von einem Bereich in der Nähe der Pedipalpenganglien nach anterior bis zur Protocerebralbrücke und darüber hinaus. Von diesen Längssträngen laufen in einem breiten Abschnitt um/zwischen Cheliceren- und Pedipalpenganglion Verbindungsfasern zum ZNS. Es existiert auch eine sehr ausgeprägte Verbindung zwischen den Stomatogastrischen Längsfaserbündeln und den Chelicerenganglien, darüber hinaus finden wir aber auch eine Verbindung zum Pedipalpenganglion. Weiterhin nehmen einige Nervenzellen des SNS Kontakt mit der Protocerebralbrücke auf. Wir können also festhalten, daß alle segmentalen anterioren ZNS-Abschnitte Verknüpfungen mit dem SNS aufweisen und keineswegs nur das Chelicerenneuromer.

Laut der Beschreibung von Scholl (1977) werden als erster Teil des SNS zwei sogenannte Stomatogastrische Ganglien in der Wand des späteren Stomodaeums gebildet. Äußerst ähnlich verläuft die Entwicklung des SNS bei *Drosophila melanogaster* und *Hommarus gammarus*. Auch bei diesen Organismen wird das SNS unabhängig vom ZNS in der Stomodaeumwand gebildet (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997; Garzino und Reichert, 1994). Bei *Drosophila* lösen sich die Vorläuferzellen des SNS vom Dach des Stomodaeums ab; für *Hommarus* liegen keine genaueren Untersuchungen über die Abkunft der Vorläuferzellen vor.

Die Stomatogastrischen Ganglien von *Limulus polyphemus* sind praeoral über die Stomodaealbrücke miteinander verbunden. Diese neurogene Zone wird während der Verlängerung des Stomodaeums ebenfalls ausgedehnt. Aus ihr entstehen die longitudinalen Faserbündel, die das invaginierende Stomodaeum begleiten. Von den Stomatogastrischen Ganglien ziehen Fasern ins Chelicerenganglion. An dieser Beschreibung sind folgende zwei Punkte festzuhalten: Zum einen erwähnt Scholl (1977) nicht die ebenfalls nachgewiesene Verbindung des ZNS mit dem Pedipalpenganglion respektive der

Protocerebralbrücke. Dies kann eventuell darauf zurückzuführen sein, daß die letztgenannten Nervenfasern recht dünn sind und somit in histologischen Schnitten ohne die Hilfe spezifischer Färbungen leicht übersehen werden können – ihre Existenz ist unzweifelhaft. Insbesondere zeigen diese zwei zusätzlichen Verbindungen des SNS, daß mehr als ein Ganglion als Ziel für die Nervenfasern dient. Diese Tatsache führt zur nächsten Implikation: Wenn wir voraussetzen, daß sich das SNS tatsächlich autonom aus der Stomodaeumwand entwickelt, gibt es keinen Grund, warum die Hauptverbindung zum ZNS ausschließlich und unveränderlich zum Tritocerebrum verlaufen soll. Es ist – insbesondere unter der Berücksichtigung der zahlreichen Zell- und Gewebewanderungen während der „Kopf“-entwicklung – durchaus möglich, daß die Nervenfasern „opportunistisch“ vorgehen und gewissermaßen das erstbeste respektive das nächstgelegene Ganglion im Bereich des sich einstülpenden Stomodaeums kontaktieren. Es scheint keineswegs zwingend zu sein, daß das Tritocerebrum anderen, eventuell näher gelegenen Gehirnabschnitten vorgezogen werden muß. Auch wenn bei Mandibulaten die Hauptverbindung zwischen SNS und Tritocerebrum verläuft, erscheint die unveränderliche Annahme, daß immer das Tritocerebrum vom SNS kontaktiert wird, eher einer Art Dogma zu entspringen, dem Dogma von der konservativen Natur des Nervensystems. Zur Bestätigung dieser Vermutung lassen sich Belege anführen. Beispielsweise findet man einen ähnlichen opportunistischen Innervierungsmodus beim Flußkrebs *Procambarus clarkii*, dessen Fusion zweier abdominalen Ganglien dazu führte, daß die Anhänge des sechsten Abdominalsegmentes auf ungewöhnliche Weise innerviert werden, wobei Nervenfasern beider verschmolzener Ganglien involviert sind (Dumont & Wine, 1987). Aber es existieren noch weitere, nicht weitgehend auf theoretischen Überlegungen beruhende Argumente, denn diese Verbindung von SNS und Tritocerebrum ist auch bei den Mandibulata keineswegs so unverbrüchlich, wie es anhand der Literaturerwähnungen immer scheint. Neuroanatomische und elektrophysiologische Untersuchungen am amerikanischen Flußkrebs *Orconectes limosus* haben gezeigt, daß die Nervenfasern des SNS ganz unterschiedliche Verbindungswege zum Gehirn haben (Böhm *et al.*, 2001). Abgesehen von sehr wenigen Neuriten, die über die circumoesophagealen Konnektive zu den kommissuralen Ganglien ziehen, erfolgt die Hauptinnervation über den sogenannten Inferioren Ventrikulärnerv (IVN). Der IVN entspringt teils im oesophagealen Ganglion, teils im Stomatogastrischen Ganglion und verläuft median der circumoesophagealen Konnektive zum postero-medianen Bereich des Gehirns. Anschließend erstreckt er sich über die gesamte Länge des Gehirns bis zum medianen Protocerebrum. Ein einzelner (!) Knoten auf Höhe der 1. Antenne (=Deutocerebrum) ist der Ausgangspunkt für stark verzweigte Nervenfasern, die sowohl in das Tritocerebrum, das Deutocerebrum und in anteriore Richtung auch in das Protocerebrum eindringen. Dieses regelrechte Dendritengeflecht durchdringt das Protocerebrum, das Deutocerebrum als auch das Tritocerebrum (Böhm *et al.*, 2001). Somit liefert auch die Verbindung zum Stomatogastrischen Nervensystem kein überzeugendes Argument für die Homologie zwischen dem Chelicerenneuromer und dem Tritocerebrum.

Wie bereits erwähnt, ergaben die vorliegenden Untersuchungen des anterioren embryonalen Nervensystems von *Limulus polyphemus* keinerlei Hinweise auf ein

zusätzliches, später reduziertes Neuromer zwischen dem Chelicerenganglion und dem Tritocerebrum. Auch findet man weder bei *Limulus polyphemus* noch bei *Tachypleus tridentatus* ein zusätzliches Anhangsknospenpaar (Kishinouye, 1891; Kingsley, 1892; Iwanoff, 1933; eigene Beobachtungen). Wenn also in Cheliceraten einst ein solches zusätzliches Segment existiert hätte – nach traditioneller Sicht das Deutocerebrum –, dann müßte es im weiteren Evolutionsverlauf verschwunden sein, ohne eine einzige Spur zu hinterlassen, auch kein transientes embryologisches Überbleibsel. Es existiert demnach keinerlei morphologische Andeutung dieses Zusatzsegmentes. Auch auf der Ebene der Genexpression fehlt jeglicher Hinweis auf ein ehemaliges Praechelicerensegment. In verschiedenen Cheliceraten wurden die Expressionsmuster der Segmentpolaritätsgene *engrailed* und *wingless* untersucht. Die prächelicerale Expression von *engrailed* beschränkt sich in Spinnen auf die Augenanlagen und das Labrum (Damen *et al.*, 1998; Abzhanov *et al.*, 1999; Damen, 2002), wohingegen sie in Milben, deren Augen reduziert sind, vollständig fehlt (Telford & Thomas, 1998). Entsprechend ist bei *Cupiennius salei* die *wingless*-Expression auf die Augen und das Labrum beschränkt (Damen, 2002).

Fassen wir die aufgeführten Argumente nochmals zusammen. Zum einen konnten wir feststellen, daß alle bisherigen Argumente, die eine Homologie zwischen Chelicerenneuromer und Tritocerebrum begründen sollen, unzureichend oder zumindest nicht überzeugend sind. Statt dessen liefern uns sowohl die Morphologie als auch Genexpressionsmuster verschiedene deutliche Hinweise auf eine Homologie zwischen dem Chelicerenneuromer von *Limulus polyphemus* und dem Deutocerebrum von Mandibulaten. Dazu zählen die praestomodaeale Chelicerenkommissur, die Struktur des circumoesophagealen Neuropilrings, insbesondere die Lage der beteiligten Neuromere und zu ihnen gehörenden Strukturen sowie das Expressionsmuster von Segmentpolaritätsgenen (Damen, 2002) und die Hoxgenexpressionsmuster (Damen *et al.*, 1998; Telford & Thomas, 1998; Hughes & Kaufman, 2002).

Natürlich ist der Verlust eines Segmentes mitnichten ausgeschlossen, aber es ist sehr schwierig, den evolutionären Verlust einer Struktur nachzuweisen, wenn außer Annahmen keinerlei phylogenetische Hinweise oder zumindest vorübergehende embryologische Spuren ihre einstige Existenz belegen oder andeuten. Letzteres findet man beispielsweise beim tritocerebralen respektive interkalaren Segment des Hexapodenkopfes. Seine Existenz kann über verschiedene embryonale Merkmale nachgewiesen werden, beispielsweise die segmental auftretenden Neuroblasten oder das Expressionsmuster von *engrailed* (Rogers & Kaufman, 1997; Scholtz 1997, 2001; Boyan & Williams, 2002). Darüber hinaus deutet das vermutete Schwestergruppenverhältnis von Hexapoda und Crustacea (Dohle, 2001) darauf hin, daß das Interkalarsegment ursprünglich ein vollständiges, mit Anhängen ausgestattetes Segment war.

Diese Argumentationslinien lassen sich schwerlich auf Cheliceraten und ihre „Kopf“-segmentierung übertragen. Sämtliche Versuche, Hinweise auf ein einst vorhandenes Segment zwischen Cheliceren und der Augenregion zu finden, erbrachten nur unbefriedigende Ergebnisse (Weygoldt, 1985). Darüber hinaus ist es noch sehr die Frage, ob die Chelicerata hinsichtlich ihrer phylogenetischen Stellung zwischen zwei Gruppen einzuordnen sind, die sowohl Antennen als auch ein Deutocerebrum besaßen. Somit führt die Überprüfung aller vorhandenen Daten sowie die Anwendung von „Ockhams

Rasiermesser“ – d.h. des Hypothesenminimalismus, der besagt, daß die einfachste Erklärung, welche die wenigsten Zusatzannahmen benötigt, mit höherer Wahrscheinlichkeit richtig ist als eine, die mehr Zusatzannahmen benötigt – zu der begründeten Annahme, daß eine Homologie zwischen dem Chelicerenneuromer und dem Deutocerebrum vorliegt.

IV.3 Das Expressionsmuster von *Distal-less*

Das räumliche und zeitliche Expressionsmuster des Homöoboxgens *Distal-less* wurde unter verschiedenen Aspekten betrachtet. Einerseits hinsichtlich der in anderen Organismen schon recht genau untersuchten Beteiligung an der Ausbildung der Extremitäten, andererseits im Hinblick auf eine Partizipierung des Gens bei der Neurogenese. Der Schwerpunkt in dieser Arbeit liegt auf dem zweiten Aspekt; diesbezüglich existieren für alle bislang untersuchten Organismen nur spärliche Daten. Allerdings ist es mittels immunhistochemischer Methoden ausgesprochen schwierig, beide Funktionen voneinander zu trennen respektive überhaupt Aussagen über die Funktion des Gens zu treffen. Dies kann nur ansatzweise auf indirektem Wege vorgenommen werden, über die Betrachtung, zu welchem Zeitpunkt in welchem Gewebe das Gen aktiv ist. Beispielsweise deutet die spezifische *Dll*-Expression in dem sich entwickelnden Pfeilschwanzkrebsgehirn, insbesondere im Lobus opticus, in den einzelnen Zellen in den Ganglien des ZNS sowie in den Nervenzellen in den Prosomaextremitäten deutlich auf eine neurospezifische Funktion des Gens hin – zumindest eine vorübergehende. Doppelmarkierungen mit Markern unterschiedlicher Spezifität können Daten über gewebe- respektive zelltypische Expressionen liefern. Aus diesem Grunde habe ich Koexpressionsexperimente mit *Dll* und dem neurospezifischen Marker Synorfl (anti-*Drosophila*-synapsin) vorgenommen. Eine Koexpression sagt jedoch noch nichts über eine Interaktion mit anderen Genen aus, die wiederum funktionelle Korrelationen liefern könnten, aber einen **Hinweis** auf eine gewebespezifische Aktivität kann eine Koexpression durchaus liefern.

Eine weitere indirekte Möglichkeit, funktionelle Zusammenhänge zu erforschen, besteht in der Verfolgung des Schicksals oder Werdeganges einzelner Zellen. Sowohl bei *Limulus polyphemus* als auch bei *Lepisma saccharina* konnte man sehr spezifisch angeordnete *Dll*-positive Zellen über einen langen Entwicklungs- respektive Expressionszeitraum verfolgen – beispielsweise in den Maxillarpalpen oder den Zellclustern, die das Prosoma umgeben, oder den Medianseiten der Coxen von *Limulus polyphemus*. Das postembryonale Schicksal dieser embryonal *Dll* exprimierenden Bereiche wurde mittels rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen verschiedener Larvalstadien bestimmt. Der Vergleich der Antikörperfärbungen mit den REM-Daten ergab eine verblüffende Übereinstimmung zwischen den Positionen von Mechanorezeptoren oder auch anderen Sinnesorganen wie Chemorezeptoren und den embryonal *Dll* exprimierenden Zellen. Diese Korrelation sowie die deutliche Expression im sich entwickelnden Gehirn, den Ganglien und begleitenden Zellen der Nervenstränge in den Prosomaanhängen deuten für sich genommen darauf hin, daß diesen späten Expressionen eine Erfordernis des *Dll*-

Genproduktes während der Entwicklung bestimmter Strukturen des Nervensystems und der Sinnesorgane zugrunde liegt. Auch wenn durch die im folgenden Kapitel diskutierten Doppelmarkierungen etliches darauf hinweist, daß die neurospezifischen *Dll*-Expressionen zu einem sehr großen Anteil in Gliazellen stattfinden, werden nachfolgend alle Bereiche, in denen eine Korrelation zwischen *Dll*-positiven embryonalen Zellen und postembryonalen Rezeptoren auftritt, diskutiert. Im nächsten Kapitel finden funktionellere Aspekte Berücksichtigung.

Neben den hier vorgelegten Daten von *Limulus polyphemus* und *Lepisma saccharina* finden wir auch bei zahlreichen anderen Organismen vergleichbare Korrelationen. In den Extremitäten adulter *Drosophila melanogaster* ist die *Dll*-Expression auf Anteile der Borsten beschränkt (Gorfinkiel *et al.*, 1997), und in bestimmten *Dll*-mutanten *Drosophila*-Stämmen kann das Gewebe keine Borsten ausbilden (Campbell & Tomlinson, 1998). In der letalen *Dll*-Mutation von *Drosophila melanogaster* fehlen die larvalen peripheren Strukturen wie Antennen und Maxillen oder labiale Sinnesorgane (Cohen & Jürgens, 1989a). Die exakte Position der *Dll*-positiven Zellen und der Borsten kann leicht verschoben sein; dieser Differenz können unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen. Einerseits können Zellwanderungen auftreten, wie es beispielsweise bei einigen *Dll*-positiven Zellen der Milbe *Archaeogozetes longisetosus* beobachtet wurde (Thomas & Telford, 1999). Andererseits kann auch eine proliferationsbedingte Zunahme der Zellanzahl der Grund sein. Deutliche Zellwanderungen sind auch von verschiedenen Gliazellen von *Drosophila melanogaster* bekannt, insbesondere von „Exit“ Gliazellen und von „Peripheral“ Gliazellen (Giagrande, 1994; Halter *et al.*, 1995). Diese Zellen verlassen das ZNS und wandern an bereits vorhandenen Neuronen zu ihren endgültigen Positionen (Giagrande, 1994; Halter *et al.*, 1995). Auch die Wanderung von einigen Neuroblasten im Gehirn von *Schistocerca gregaria* geht allem Anschein nach auf die Gliazellen zurück, die man an jedem Proliferationszentrum und vergesellschaftet mit Neuroblasten findet (Reichert & Boyan, 1997). Innerhalb der Orthoptera scheint es relativ konstant zu sein, welche Zelle an welche Position wandert (Boyan *et al.*, 1995). Unabhängig von Borsten finden wir jedoch auch Korrelationen von *Dll*-Expressionen und anderen nervösen Strukturen. Beispielsweise zeigt das 2. Antennensegment von *Lepisma saccharina*, der Pedicellus, eine auffallend distinkte Expression. Der Pedicellus beherbergt das Johnstonsche Organ, ein Chordotonalorgan, also ein spezifischer Mechanorezeptor, der die Position der Antenne mißt. Auch in den Maxillarpalpen findet man *Dll*-exprimierende Zellen und verschiedene Mechano- und Chemorezeptoren an ähnlichen Positionen.

Neben diesen recht eindeutigen Korrelationen ergeben sich jedoch auch schwieriger zu interpretierende Ergebnisse, beispielsweise die Expression in den basalen Loben der beiden Maxillenpaare von *Lepisma saccharina*, also von Lacinia, Galea, Glossa, und Paraglossa. Man nimmt an, daß es sich bei diesen Strukturen um gnathobasische Endite handelt (Heymons, 1897; Boudreaux, 1987). Somit sind sie Teil des Coxopoditen. Neben der *Dll*-Expression in den Enditen verschiedener Crustaceen und Hexapoden (Panganiban *et al.*, 1995; Niwa *et al.*, 1997; Rogers & Kaufman, 1997; Scholtz *et al.*, 1998; Williams, 1998; Mittmann, 2000; Mittmann & Scholtz, 2001; Williams *et al.*, 2001) ist dies ein weiterer Beweis gegen die Annahme, daß nur der Telopodit *Dll* exprimiert (González-Crespo & Morata, 1996; Niwa *et al.*, 1997). Dennoch ist die Funktion dieser Expression

keineswegs eindeutig. Denn einerseits könnte die *Dll*-Expression mit dem Auswachsen der Knospen selber zusammenhängen, was mit der Vermutung übereinstimmen würde, daß für die meisten Knospungsvorgänge eine *Dll*-Expression notwendig ist, ob sie nun in Extremitäten oder in mit diesen in Verbindung stehenden Anhängen vorkommt (Panganiban *et al.*, 1997). Andererseits könnte die genannte Expression in den Maxillarloben auch mit der Ausbildung der zahlreichen Sensilla trichoidea zusammenhängen, die man auf den entsprechenden Fortsätzen findet (Larink, 1978; Mittmann & Scholtz, 2001). Da die *Dll*-Expression zumindest in der Paraglossa erst nach Auswachsen der Knospe auftaucht, halte ich die letztgenannte Möglichkeit für wahrscheinlicher.

Eine kürzlich erschienene Studie an *Glomeris marginata* bestätigt diese Annahme (Prpic & Tautz, 2003). Dies ist die erste umfassende Untersuchung der *Dll*-Expressionen bei einem Myriapoden. Es lassen sich, ähnlich wie bei *Limulus polyphemus* und *Lepisma saccharina*, mehrere Funktionen von *Dll* nachweisen. In der Antenne von *Glomeris* finden sich – wie bei *Lepisma* auch – sowohl Expressionen, die der Ausbildung der pd-Achse zuzuordnen sind, als auch nervös korrelierte Expressionen (Mittmann & Scholtz, 2003; Prpic & Tautz, 2003). In den Mandibeln und Maxillen scheint bei *Glomeris marginata* keinerlei *Dll*-Expression mit der Festlegung der pd-Achse in Zusammenhang zu stehen, sondern ausschließlich mit der Ausbildung von Sinnesorganen (Prpic & Tautz, 2003). Allerdings tritt wie in allen Segmenten eine prämorphogenetische Expression auf, die normalerweise mit der Ausbildung der pd-Achse in Verbindung gebracht wird (Cohen & Jürgens, 1989a,b). Auch im Prämandibularsegment erscheint eine transiente Expression (Prpic & Tautz, 2003); diese unterscheidet *Glomeris* von *Lepisma* und allen untersuchten Hexapodenvertretern, denn im homologen Interkalarsegment fehlt auch diese transiente Expression (Mittmann, 1998, 2000; Scholtz *et al.*, 1998). Im Unterschied zu den Ausführungen von Prpic & Tautz (2003) kann aufgrund des frühen Expressionsmusters in den Maxillen von *Lepisma saccharina* eine anfängliche pd-Achsenbildungsfunktion nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden, denn im Anschluß an die prämorphogenetische Expression folgt in den Maxillarpalpen eine distale Expression (Mittmann, 1998, 2000), die nicht von der typischen pd-Achsen-bedingten Expression in den Thoraxbeinen zu unterscheiden ist. Zwar finden sich auch am Maxillarpalpus etliche Sinnesrezeptoren, und späte *Dll*-Expressionen scheinen eindeutig neurospezifisch zu sein, doch kann ohne Funktionsanalyse nicht festgestellt werden, ob die gesamte Expression ausschließlich eine neurospezifische Ursache hat. Ähnliches gilt für die Expression in den Maxillen von Collembolen (Mittmann, 1998, 2000; Scholtz *et al.*, 1998). Da bei Hexapoden keine *Dll*-Expression in den Mandibeln auftritt, woraus sich das apomorphe Merkmal „Entwicklung einer Mandibel ohne *Dll*-Expression“ ableitet (Scholtz *et al.*, 1998; Mittmann, 2000), können diese Daten nicht mit denen von *Glomeris* verglichen werden. Sie können aber sehr wohl als Hinweis darauf gewertet werden, daß es durchaus möglich ist, daß keinerlei pd-Achsen bedingte Expression auftreten muß, sondern auch eine ausschließlich neurospezifische Funktion die Expressionsursache sein kann. Allerdings konnte diese schwierige funktionelle Frage auch bei *Glomeris* nur indirekt gelöst werden; Funktionsanalysen sind im Moment nicht möglich (Prpic & Tautz, 2003), was die Interpretation beispielsweise zeitlich überlappender Expressionen unmöglich macht.

Betrachten wir die Daten von *Limulus polyphemus* nochmals genauer, denn es stellen sich ähnliche Schwierigkeiten bei der Deutung ein. Im großen und ganzen bestätigen die Daten von *Limulus polyphemus* die Annahme, daß *Dll* an der Ausbildung von Mechano- und Chemorezeptoren beteiligt ist (Mittmann & Scholtz, 2001) und darüber hinaus an der Ausbildung bestimmter Strukturen des ZNS. Unzweifelhaft ist dies bei den Expressionen im sich entwickelnden Lobus opticus, den einzelnen Zellen in den Ganglien sowie den ebenfalls *Dll*-positiven Zellen in den Prosomaanhängen, in denen sowohl Zellen im Trochanter als auch Zellen entlang der Nervenfasern, die die beiden *Dll*-positiven Zellcluster miteinander verbinden, eine Genaktivität zeigen. Ein neurospezifischer Zusammenhang scheint eindeutig zu sein (Mittmann & Scholtz, 2001). Für die Expression in den Gnathobasen sind wiederum mehrere Interpretationen denkbar. Laut Snodgrass (1952) und anderen Autoren handelt es sich bei dem dornentragenden Teil der Gnathobase um einen coxalen Enditen. Es stellt sich demnach wieder die Frage, ob der Knospungsvorgang selber oder die Entwicklung des umfangreichen Nervenplexus, das die beweglichen Dornen innerviert, die Ursache für die *Dll*-Expression ist. Wiederum erscheint mir ein neurospezifischer Zusammenhang wahrscheinlicher zu sein, einerseits wegen der äußerst ähnlichen starken Innervierung der Dornen in der Gnathobasis und im Trochanter (Hayes & Barber, 1967). Aber darüber hinaus existiert auch ein Negativbeweis, denn die *Dll*-Expression in der Gnathobase des letzten Laufbeinpaars ist deutlich schwächer ausgeprägt als in den restlichen Beinen. Diese Gnathobase ist die einzige, die sowohl bei der frisch geschlüpften Larve als auch beim adulten Tier nur sehr wenige Dornen trägt. Auch die Chilarien liefern Daten für einen neurospezifischen Zusammenhang, denn sie sind zum einen ebenfalls mit (wenigen) Dornen besetzt, zum anderen setzt eine *Dll*-Expression erst in einem sehr späten Stadium ein, d.h. eine ganze Weile nach der Ausknospung. Für die Knospung selber wurde das *Dll*-Genprodukt wie bei den Hexapodenmandibeln (Panganiban *et al.*, 1995; Niwa *et al.*, 1997; Roger & Kaufman, 1997; Mittmann, 1998; Popadic *et al.*, 1998; Scholtz *et al.*, 1998; Mittmann, 2000) nicht benötigt, und es liegt auch keine prämorphogenetische Expression vor.

Die Borsten auf dem Prosoma und insbesondere die Conus-Sensillen entlang der Prosomakante liefern schlagende Übereinstimmungen, nicht nur hinsichtlich der positionellen Identität der *Dll*-positiven Zellen mit den später entwickelten Conus-Sensillen, sondern auch hinsichtlich der Anzahl *Dll*-positiver Zellen in einem Zellcluster und der Anzahl der Neurone, aus denen ein Conus-Sensillum zusammengesetzt ist. Jedes Conus-Sensillum besteht aus 8-10 Neuronen (Kaplan *et al.*, 1976), und jedes Zellcluster enthält 8-12 *Dll*-positive Zellen. Damit ist nicht gesagt, daß diese Neurone *Dll* exprimieren (siehe III.5.1), aber es ist eine auffällige Übereinstimmung.

Beim Genitaloperculum und den Blattbeinen am Opisthosoma ist die Korrelation nicht ganz so eindeutig wie bei den eben erwähnten Strukturen. Da bereits in recht frühen Stadien des Ausknospens der opisthosomalen Blattbeine ein *Dll*-exprimierender Streifen von Zellen erkennbar ist, ist es durchaus möglich, daß diese Expression mit dem Knospungsvorgang zusammenhängt. Andererseits trägt die Kante dieser flachen, halbkreisförmigen Anhänge einen Saum langer Borsten, jeweils ca. 3-5 Borsten stehen leicht versetzt nebeneinander. Somit kann auch die Innervierung dieser Sinnesorgane der Grund für eine neurospezifische *Dll*-Expression sein. In den Buchlungen von Spinnen

scheinen die Verhältnisse etwas anders zu sein, denn Popadic *et al.* (1998), Abzhanov *et al.* (1999) und Damen *et al.* (2002) fanden erst in späten Embryonalstadien eine *Dll*-Expression in den Buchlungen und den Lungendeckeln. Somit besteht hier ein Unterschied zumindest hinsichtlich des zeitlichen Auftretens einer *Dll*-Expression, obwohl die Buchkiemen von Xiphosuren und die Buchlungen von Spinnen als homologe Organe gelten.

Bei den Lateraldornen des Pfeilschwanzkrebsopisthosomas besteht generell wieder die Möglichkeit, daß die bereits in einem frühen Stadium einsetzende Expression mit dem Knospungsvorgang der Lateraldornen respektive mit einem jeweils anterior von ihnen gelegenen Fortsatz verknüpft ist. Andererseits fungieren die Lateraldornen ihrerseits als hochinnervierte Sinnesorgane und sind je mit ca. 300 Conussensillen bedeckt (Fahrenbach, 1999; siehe auch III.5.1).

Betrachten wir nochmals die prosomalen Extremitäten verschiedener Arthropoden. Bei *Limulus polyphemus* finden wir in den prosomalen Laufbeinen zwei deutliche Expressionsdomänen von *Dll*, eine im distalen, eine im proximalen Bereich. Es bestehen jedoch gravierende Unterschiede zu den Expressionsmustern von *Drosophila melanogaster* und *Gryllus bimaculatus* und apterygoten Insekten (Panganiban *et al.*, 1994; Gonzáles-Crespo & Morata, 1996; Niwa *et al.*, 1997; Mittmann, 1998). Alle bislang untersuchten Arthropoden zeigen eine distale *Dll*-Expression in ihren Extremitäten, für einige Arten wurde darüber hinaus eine ringförmige Expression im Trochanter und in Teilen des Femur festgestellt. Diese konnte bei *Limulus polyphemus* zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Statt dessen finden wir einen ausgedehnten *Dll*-positiven Bereich an der Gnathobase. Im Trochanter exprimiert nur ein kleines, distal gelegenes Zellcluster *Dll*. Da eine ringförmige *Dll*-Expression, wie sie bei den Hexapoden gefunden wurde, weder bei Crustaceen noch Cheliceraten nachgewiesen werden konnte (Grenier *et al.*, 1997; Popadic *et al.*, 1998; Abzhanov *et al.*, 1999; Thomas & Telford, 1999; Abzhanov & Kaufman, 2000), scheint es sich hierbei eher um ein hexapoden-spezifisches Merkmal zu handeln. Nur beim Myriapoden *Glomeris marginata* finden wir eine leicht heterogene Expression in den Extremitäten, bei der die Expression im Trochanter und der Anhangsspitze etwas ausgeprägter zu sein scheint (Prpic & Tautz, 2003), aber ein deutlicher Ring wie bei Hexapoden ist nicht erkennbar.

Die beschriebenen Korrelationen zwischen *Dll*-positiven Zellen der Embryonalstadien von *Limulus polyphemus* und *Lepisma saccharina* und der späteren Position von Sinnesorganen führen zu dem Schluß, daß *Dll* in irgendeiner Weise an der Ausbildung von Mechano- und Chemorezeptoren beteiligt ist (Mittmann & Scholtz, 2001). Untersuchungen von Williams *et al.* (2001) an verschiedenen Branchiopodenarten bestätigten ebenfalls die Korrelation zwischen *Dll*-positiven Zellen und Borsten, also Sinnesrezeptoren.

Somit scheint *Dll* im Verlauf der Arthropodenembryogenese mindestens eine Doppelfunktion zu erfüllen. Einerseits ist es an der Ausbildung der pd-Achse von Extremitäten und ihren Derivaten beteiligt, andererseits partizipiert es an der Entwicklung verschiedener Rezeptoren, insbesondere Mechanorezeptoren und dem ZNS. Mittmann & Scholtz (2001) leiteten folgenden Ablauf hinsichtlich der Evolution des Gens und der lokomotorischen Anhänge der bilateralsymmetrischen Tiere ab: *Dll* ist im Tierreich extrem

weit verbreitet, es wurde beginnend beim Nematoden *Caenorhabditis elegans* über polychaete Anneliden und allen Arthropodengruppen bis zu Vertebratenvertretern nachgewiesen (Panganiban *et al.*, 1995, 1997; Lowe & Wray, 1997). Ein verblüffendes Resultat dieser vielfältigen Untersuchungen war, daß orthologe *Dll/Dlx*-Gene in den Parapodien von Anneliden, den Lobopodien von Onychophoren, verschiedensten Arthropodenextremitäten, den Ambulakralfüßchen von Echinodermen, den Flossen von Fischen sowie den Gliedmaßenknospen von Mäusen zu finden sind. Diese Anhänge stellen jedoch keineswegs homologe Organe dar (siehe auch Tabin *et al.*, 1999). Aus diesen taxonübergreifenden Expressionsmustern kann man schließen, daß *Dll* ein phylogenetisch altes Gen sein muß, das sich zu einem frühen Zeitpunkt der langen Stammesgeschichte der Tiere entwickelt hat. Damit ist jedoch noch keine Aussage hinsichtlich seiner ursprünglichen und seiner später zumindest dualen Funktion getroffen. Läßt man die bislang bekannten *Dll*-Expressionsmuster Revue passieren, stößt man auf drei erst einmal voneinander unabhängige Prozesse, an denen das Gen beteiligt ist:

- 1) Die Etablierung des animalen Pols während der Furchung (Lee & Jacobs, 2000)
- 2) Die Entwicklung der Extremitäten und ihrer Derivate, insbesondere die Festlegung der pd-Achse
- 3) Die Entwicklung des Nervensystems

Da alle untersuchten Organismen in irgendeinem Bereich des Nervensystems *Dll/Dlx* exprimieren, wurde bereits spekuliert, daß eine ursprüngliche Funktion des Gens in der Beteiligung an der Entwicklung des Nervensystems liegt (Panganiban *et al.*, 1997). Wie jedoch die Daten an Hexapoden und Cheliceraten (Mittmann & Scholtz, 2001), an Crustaceen (Williams *et al.*, 2001) sowie an Myriapoden (Prpic & Tautz, 2003) zeigen, ist *Dll* keineswegs nur auf Bereiche des ZNS begrenzt, sondern spielt bei der Differenzierung von Sinnesorganen ebenfalls eine entscheidende Rolle. Eine vergleichbare ancestrale neurogenetische Funktion wurde bereits für andere Entwicklungsgene angenommen, darunter die HOX-Gene, und führte zu der Idee eines „neuronalen Zootyps“ (Deutsch & Guyader, 1998). Es existieren ausreichend Gründe für die Annahme, daß die Stammart der Bilateria zahlreiche oder sogar die meisten Entwicklungsgene zur Ausbildung eines funktionstüchtigen ZNS und peripheren NS benötigte. Wodurch kann dann aber ein Funktionswandel oder die Etablierung einer zusätzlichen Funktion dieses Gens oder auch ganzer Genkomplexe zustande gekommen sein? Es existiert kein vernünftiger Hinweis darauf, daß die Stammart der Bilateria bereits mit irgendwelchen lokomotorischen oder sensorischen Anhängen ausgestattet war (Ax, 1995). Aus diesem Grunde ist es mehr als unwahrscheinlich, daß *Dll* bereits eine Funktion im Zusammenhang mit Ausknospungsprozessen irgendwelcher Urbilateria hatte. Nehmen wir jedoch an, daß die ursprüngliche Funktion von *Dll* vielmehr in der Beteiligung an der Ausbildung von Sinnesorganen lag, bietet sich uns damit ein möglicher Ausgangspunkt für die Entwicklung von Körperanhängen in den verschiedenen Bilateria-Linien. Denn schon kleine Veränderungen können bereits einen Vorteil darstellen, der ein besseres Überleben ermöglicht, wenn sich beispielsweise die ehemals auf der recht ebenen Körperoberfläche befindenden Sinnesorgane statt dessen auf kleinen Erhebungen oder Auswüchsen

befinden; dies kann eine feinere räumliche sensorische Auflösung bewirken. Zu diesem Zeitpunkt war *Dll* noch nicht am Prozeß der Ausknospung selber beteiligt, was durchaus möglich ist, denn wir finden innerhalb der Arthropoda durchaus Anhänge wie beispielsweise die Mandibel aller Hexapoda, bei denen *Dll* nicht für den Knospungsprozeß benötigt wird (Panganiban *et al.*, 1995; Niwa *et al.*, 1997; Roger & Kaufman, 1997; Mittmann, 1998; Popadic *et al.*, 1998; Scholtz *et al.*, 1998; Mittmann, 2000; für die allgemeine Frage der Korrelation zwischen Genexpressionsmuster und der Evolution morphogenetischer Abläufe liefert Budd (1999) einen interessanten Beitrag). Im weiteren Evolutionsverlauf kann *Dll* unabhängig voneinander in den verschiedenen Stammlinien der Bilateria für die Anhangsbildung okkupiert worden sein. Die Vorstellung dieses Ablaufs wird dadurch wahrscheinlicher, daß *Dll* ja bereits an der Etablierung des animalen Pols während der Furchung beteiligt ist, wofür ein ganz ähnlicher Mechanismus benötigt wird wie für die Festlegung einer pd-Achse in den Extremitäten (Minelli, 2000). Auch für diese frühe Entwicklungsfunktion wird angenommen, daß sie bereits im Vorfahren der rezenten Bilateria ausgeprägt gewesen sein kann (Lee & Jacobs, 2000). Zusammenfassend können wir festhalten, daß sich einige überzeugende Argumente für die Annahme finden lassen, daß die lokomotorischen Extremitäten aus sensorischen Anhängen entstanden sind, die erst sekundär in die Fortbewegung der Bilateria involviert wurden. Da *Dll* sowohl bei der Differenzierung der Körperachse als auch von sensorischen Strukturen beteiligt ist, kann es berechtigterweise als einer der Kandidaten gewertet werden, der unabhängig in verschiedenen Stammlinien an der Ausbildung der Beine beteiligt war. In frühen Embryonalstadien scheint die *Dll*-Expression für die Errichtung der pd-Achse verantwortlich zu sein, in späteren Stadien für die Ausbildung von Teilen des ZNS und insbesondere Sinnesorganen. Williams *et al.* (2001) bestätigen diese evolutionären Schlußfolgerungen anhand ihrer Untersuchungen an Branchiopodenvertretern.

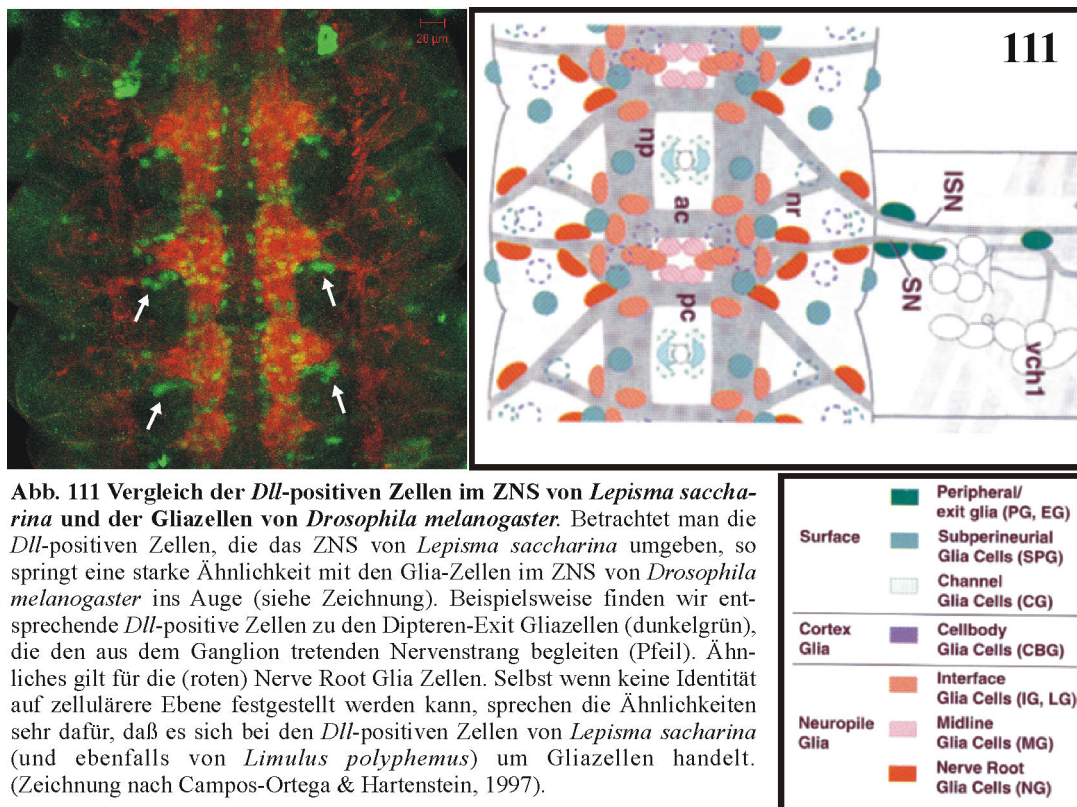
IV.4 Anti-*Distal-less*/Anti-Synorfl-Doppelmarkierungen

Aufgrund der im vorherigen Abschnitt angeführten Daten wurde vermutet, daß die Übereinstimmung zwischen den erwähnten *Dll*-Expressionen und der Position von Borsten oder anderen Sinnesorganen im Labrum, den Mandibeln, Antennen, Cerci, Terminalfilum Analvalven, Lateraldornen, Conussensillen etc. durch die Entwicklung von Neuronen oder Gliazellen hervorgerufen wird (Mittmann & Scholtz 2001). Mittlerweile konnte im Gehirn von *Drosophila melanogaster* mittels des Glia-spezifischen Antikörpers RK2 eine Koexpression mit *Dll* in einigen Gliazellen nachgewiesen werden (Panganiban & Rubinstein, 2002). Bei *Limulus polyphemus* und *Lepisma saccharina* führten Vorversuche mit dem Antikörper RK2 zu keiner eindeutigen Markierung (Daten nicht abgebildet). Dafür ergaben die Doppelmarkierungen Anti-*Dll*/Synorfl einigen Aufschluß über die genannten Expressionsbereiche von *Dll* im Nervensystem und unterstützten nochmals die enge Korrelation von *Dll* und der Entwicklung verschiedener Sinnesorgane respektive des ZNS. Am deutlichsten kann dies am Opisthosoma von *Limulus polyphemus* sowie im ZNS und am Kopf mit seinen Anhangsorganen und den Laufbeinen von *Lepisma saccharina* gezeigt werden. Allerdings ist es nach wie vor äußerst schwierig und mit den hier

angewendeten Methoden weitgehend ausgeschlossen, eine genaue Funktionsanalyse zu tätigen.

Eine Negativkorrelation können wir jedoch zu Beginn festhalten: Weder bei *Limulus polyphemus* noch bei *Lepisma saccharina* zeigten Zellen **beide** Markierungen. In keinem Fall ergab sich eine *Dll*-Färbung im Nucleus und gleichzeitig eine Synapsin-Markierung auf der Zelloberfläche respektive in den Axonen. Somit scheint es sich bei den *Dll*-positiven Zellen nicht um primäre Neurone im Sinne Hanströms (1928) zu handeln. Jedoch sind die *Dll*-positiven Zellen vor allem in späteren Stadien direkt zu Axonen/Neuronen oder mutmaßlich auch offenen Nervenendigungen benachbart, wenn sie nicht direkt im/am ZNS liegen wie im Falle des Lobus opticus.

Betrachtet man das strickleiterförmige ZNS von *Lepisma saccharina*, so ist es über und über mit *Dll*-exprimierenden Zellen bedeckt. Die Ganglien werden von diesen Zellen regelrecht „umhüllt“. Dieses Muster setzt sich bis in den Kopf fort, in dem neben der ausgeprägten Expression in der Labrumspitze der gesamte circumoesophageale Neuropilring inklusive der optischen Loben respektive des gesamten Protocerebrums und Deuto-/Tritocerebrums von *Dll*-positiven Zellen bedeckt ist. Das Muster in den Antennen scheint anders zu sein. Auch in ausgedehnten Bereichen des Kopfappens exprimieren zahlreiche Zellen *Dll*. Form und räumliche Verteilung der *Dll*-positiven Zellen im ZNS von *Lepisma saccharina* zeigen eine verblüffende Ähnlichkeit mit den verschiedenen Typen von Gliazellen, die bereits von *Drosophila melanogaster* bekannt sind (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997; Ito *et al.*, 1994). Bei Arthropoden, insbesondere beschrieben für *Drosophila melanogaster*, wird eine Unterscheidung in verschiedene Kategorien getroffen – Surface Glia, Cortex Glia und Neuropile Glia –, die ihrerseits wiederum Untereinheiten beinhalten (Abb. 111)



Obwohl bislang keine vergleichbar exakte Beschreibung von Gliazellen von *Lepisma saccharina* vorliegt, kann man anhand der Lage und der Form der Zellen markante Ähnlichkeiten feststellen. In einer Zellgruppe sind die Ähnlichkeiten so auffallend, daß kategoriale Homologisierungsversuche gerechtfertigt erscheinen. Bei *Drosophila melanogaster* finden sich drei auffallend große Gliazellen, die Ito *et al.* (1994) dem PNS zuordnen. Diese Nervenstrang-assoziierten „Exit“-Gliazellen liegen direkt hintereinander an der ZNS-Austrittsstelle des Intersegmentalnerven und des Segmentalnerven. Am Intersegmentalnerven befindet sich eine Peripheral/Exit-Gliazelle, am Segmentalnerven zwei (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997; Ito *et al.*, 1994). Aus diesem Grund fallen die genannten Zellen in die Kategorie „nerve associated“ (Ito *et al.*, 1994). Ziemlich exakt in einer transversalen Linie mit dem posterior gelegenen Segmentalnerv ist das Neuropil von einigen Gliazellen einer anderen Kategorie bedeckt (Oberkategorie Neuropile Glia). Hier bilden Interface Gliazellen sowie Nerve Root Gliazellen eine transversale Gerade (Campos-Ortega & Hartenstein, 1997). Betrachten wir nochmals die Abbildung von *Lepisma saccharina*, so finden wir Peripheral/Exit Gliazellen, die jeweils mit dem Intersegmental respektive Segmentalnerv assoziiert sind, sowie Neuropilgliazellen, die in einer Transversalen verlaufen. Auch wenn keine Homologisierung auf zellulärer Ebene vorgenommen werden kann, haben wir hiermit überzeugende Gründe für die Annahme, daß es sich bei diesen *Dll*-positiven Zellen ebenfalls um Gliazellen handelt, gegebenenfalls auch um die gleichen Kategorien wie bei *Drosophila melanogaster*. Die Untersuchungen von Whittington *et al.* (1996) an *Ctenolepisma longicaudata* ergeben ein ähnliches Bild. Die Gliazellen sind wie bei *Drosophila melanogaster* in einer extrem dorsalen Position; sie bilden bereits vor der Axogenese Fortsätze aus, die den größten Teil der Dorsalseite bedecken. Diese können natürlich mit dem Kernmarker *Dll* nicht sichtbar gemacht werden. Bei *Ctenolepisma longicaudata* finden Whittington *et al.* (1996) keine Regelmäßigkeiten in den Zellpositionen, berichtet wird von unterschiedlichen Anordnungen. Betrachtet man die Markierungen bei *Lepisma saccharina* ohne konfokales Mikroskop, kann derselbe - ungeordnete - Eindruck entstehen. Fertigt man jedoch optische Schnittserien an, kann man sehr wohl eine gewisse Symmetrie erkennen, einerseits hinsichtlich der größeren Exit-Gliazellen, andererseits auch der transversalen „Reihe“ verschiedener Gliakategorien. Ein ganz ähnliches Bild mit geringfügig anderen Zellzahlen beschreiben Giagrande (1994) und Halter *et al.* (1995) für *Drosophila melanogaster*. In Stadium 17 reihen sich pro Hemisegment vier Exit-Gliazellen und vier bis fünf Peripheral-Gliazellen am Segmentalnerv zwischen dem ventralen Nervenstrang und dem lateralen Chordotonalorgan auf.

Für *Drosophila melanogaster* wurde bereits eine *Dll*-Expression in Gliazellen des ventralen Nervenstrangs als „unpublished observations“ vermerkt (Panganiban & Rubinstein, 2002), die Daten leider jedoch nie abgebildet. Der Vergleich der *Dll*-positiven Zellen entlang des ventralen Nervenstranges und der die Ganglien verlassenden Nervenfasern bei *Lepisma saccharina* mit der Lage der Gliazellen in den gleichen Abschnitten bei *Drosophila melanogaster* machen es jedoch sehr wahrscheinlich, daß es sich bei *Lepisma saccharina* ebenfalls um Gliazellen handelt, die *Dll* exprimieren.

Bei *Limulus polyphemus* sind die *Dll*-positiven Zellen im ZNS bei weitem nicht so zahlreich wie bei den erwähnten Hexapoden und scheinen sich eher median zu

konzentrieren. Über die Funktion kann auf diesem Wege keine Aussage gemacht werden, es besteht jedoch eine Ähnlichkeit mit den *Dll* exprimierenden Zellen bei *Drosophila melanogaster* und *Lepisma saccharina*.

Bei *Glomeris marginata* hingegen beschränkt sich die *Dll*-Expression im ZNS auf das Gehirn, insbesondere auf den Bereich des späteren Lobus opticus und der Corpora pedunculata (Prpic & Tautz, 2003). Außerhalb des Gehirns findet sich keine *Dll*-Expression im ZNS, weder in einzelnen Zellen der Ganglien oder an ihnen, wie bei *Limulus polyphemus*, noch in Zellen wie den mutmaßlichen Gliazellen von *Lepisma saccharina* oder *Drosophila melanogaster*. Dieses völlige Fehlen einer *Dll*-Expression im ventralen Bauchmark ist verblüffend, denn wir finden diese Expression ja nicht nur bei den genannten Vertretern, sondern unter anderem bei Lepidopteren, Onychophoren und im neurogenen Ektoderm eines Polychaeten (Panganiban *et al.*, 1997). Ob in allen genannten Vertretern eine Korrelation zu Gliazellen vorliegt, wurde nicht untersucht, bei Hexapoden scheint sie zweifelsfrei zu bestehen. Aber auch wenn wir annehmen, daß eine Gliazellenspezifische Expression erst bei Hexapoden auftritt, finden wir dennoch *Dll*-Expressionen unbekannter Herkunft bei zahlreichen anderen Vertretern. Doch bevor nicht weitere Funktionsanalysen vorliegen, beispielsweise durch Koexpression mit Glia-spezifischen Markern, bewegen wir uns hier auf unsicherem Terrain.

Eine weitere Übereinstimmung zwischen *Limulus polyphemus*, *Drosophila melanogaster* und *Glomeris marginata* ist die *Dll*-Expression in Lobus opticus (Kaphingst & Kunes, 1994; Prpic & Tautz, 2003), wobei in beiden Fällen die Bedeutung der *Dll*-Expression in diesen Zellen völlig unklar ist. Bei *Limulus polyphemus* finden wir darüber hinaus noch einige *Dll*-positive Zellen im Medianlobus; auch über die Funktion dieser Expression kann bislang nur spekuliert werden.

Die Doppelmarkierung in den Beinen und Antennen von *Lepisma saccharina* erbrachte weitere interessante Ergebnisse. Viel wurde bislang über die streifenförmige Expression in den Extremitäten verschiedener Hexapoden gerätselt (Cohen, 1993; Williams & Nagy, 1996; Panganiban *et al.*, 1997; Niwa *et al.*, 1997; Couso & Bishop, 1998), jedoch bislang ohne überzeugende Erklärungen hervorzubringen. Auch an dieser Stelle kann uns der Vergleich der Position verschiedener Sinnesorgane und markierter Zellen weiterbringen.

Bei der Betrachtung der Doppelmarkierung mit Synorfl (Anti-Synapsin) und *Dll* in der Antenne von *Lepisma saccharina* fällt folgendes auf: Die Antenne ist von einem dicken Nervenstrang durchzogen, der sich im dritten Antennenglied aufzuspalten scheint. Im ersten Antennenglied finden wir zentral, jedoch im distalen Bereich des Scapus, ein großes Konglomerat von Nervenzellen. Von diesem (oder vom darin verlaufenden Zentralstrang) ziehen zahlreiche Fasern in den distal gelegenen Pedicellus, wo sie in eher randständige Zellen auslaufen. Eine schwach wirkende *Dll*-Expression finden wir im Scapus, genauer gesagt in tiefer gelegenen Zellen in direkter Nachbarschaft zu den Synorfl-markierten Nervenzellen. Auch der von der Antenne ins Deutocerebrum verlaufende Strang wird von *Dll*-positiven Zellen begleitet. Die *Dll*-Expression im Pedicellus ist äußerst distinkt, es scheinen vor allem oberflächlich liegende Zellen das Gen stark zu exprimieren. Im dritten Antennensegment findet man neben dem zentralen Nervenstrang ein eher spindelförmiges, ebenfalls zentral gelegenes Nervenkonglomerat, das mit einem von proximal kommenden

Strang verknüpft ist. Einige *Dll*-positive Zellen finden sich in dem spindelförmigen Teil. Es wurde vermutet, daß die Expression im Pedicellus mit der Existenz des Johnstonschen Organs zusammenhängen könnte (Mittmann, 1998; Mittmann & Scholtz, 2001). Das Johnstonsche Organ ist ein Scolopidalorgan, dessen in die Tiefe versenkte Sinneszellen über mit der Cuticula verbundene Hilfszellen die Geißelschwingungen messen. Laut Snodgrass (1958) ist die Ausbildung dieses Organs die Ursache für die Reduktion der ehemals in diesem Glied vorhandenen Muskulatur. Auch im Johnstonschen Organ ist eine gliazellenspezifische Expression durchaus möglich. Woher aber rühren die Expressionen im Scapus und im dritten Antennenglied? Neben dem Johnstonschen Organ im Pedicellus befindet sich im ersten Antennenglied von *Lepisma saccharina*, einigen Orthopteren und Hemipteren (Bullock & Horridge, 1965) ebenfalls ein Chordotonalorgan. Auch wenn für *Lepisma saccharina* keine detaillierten Beschreibungen vorliegen, so kann man über den Vergleich mit der Lage der Chordotonalorgane in den Antennen von anderen Insekten, die teils ebenfalls viele ursprüngliche Merkmale aufweisen (Orthoptera, Coleoptera [*Meconemus* spec.]), weitere Hinweise finden. Denn die detailreiche Abbildung von Debauche (1936) der Antennen von *Meconemus* zeigt im Scapus ein zentral gelegenes, das Glied schräg durchlaufendes Chordotonalorgan, im Pedicellus sowohl zwei zentral gelegene Chordotonalorgane als auch das zum Rand hin gelegene Johnstonsche Organ; darüber hinaus findet man im dritten Antennenglied ein weiteres, mit der Masse der Zellkörper zentral gelegenes Chordotonalorgan. Lage und Ausprägung in den ersten beiden Antennengliedern scheinen bei *Lepisma saccharina* übereinzustimmen. Die ausgeprägte *Dll*-Expression im Pedicellus kann durch die oberflächliche Lage des Johnstonschen Organs zustandekommen, zusätzlich auch durch eine weitere Anzahl von zentral gelegenen Zellen, die *Dll* exprimieren. Die weniger distinkte Expression im dritten Glied wiederum kann durch die Expression von ausschließlich im Inneren des Gliedes gelegenen Zellen herrühren, die entweder den Zentralstrang oder ein weiteres Chordotonalorgan begleiten. Betrachtet man die allgemeine Struktur von Chordotonalorganen, ist wiederum eine *Dll*-Expression in Gliazellen nicht unwahrscheinlich. Denn ein Chordotonalorgan besteht aus einem bis ein paar hundert Chordotonalsensillen, von denen jede aus einer Nervenzelle und zwei bis drei anderen Zellen (Hüllzellen etc.) zusammengesetzt ist (Bullock & Horridge, 1965). Man nennt eine solche Untereinheit ein Scolopidium (Bullock & Horridge, 1965). Einfache Chordotonalorgane bestehen aus wenigen Scolopidien – diese findet man verstreut über Körper und Anhänge von Hexapoden (Bullock & Horridge, 1965). Komplexe Chordotonalorgane wie Tympanalorgane, Johnstonsches Organ oder subgenuale Organe bestehen aus zahlreichen Scolopidien. Chordotonalorgane gehen ursprünglich wohl auf cuticulare Sinnesorgane zurück (Bullock & Horridge, 1965), denn man findet noch Übergangsformen bei Larven des Cerambyciden *Monohammus* (Hess, 1917). Betrachten wir die Laufbeine von Hexapoden, so stoßen wir ebenfalls auf interessante Korrelationen. Laut Bullock & Horridge (1965) haben alle Insekten Chordotonalorgane in ihren Beinen (wobei endognathe Insekten bei den Autoren nie Erwähnung finden), und zwar in folgender Anordnung:

- 1) immer im Femur, wobei in zahlreichen Ordnungen zwei Stück pro Femur existieren, eines ist kompakt („condensed“), eines ist weitläufiger („dispersed“)

- 2) eines oft distal-tibial, das heißt im Übergangsbereich zum Tarsalglied
- 3) eines tarsal-praetarsal
- 4) eines subgenual im proximalen Tibiabereich. Bei *Machilis* soll dieses Chordotonalorgan fehlen (Debaisieux, 1938)

Im allgemeinen sind diese Organe in irgendeiner Weise mit Gelenken verbunden. Das femurale Scolopidium ist proximal mit der Femurhypodermis verbunden und distal mit dem Kniegelenk oder dem Extensormuskel der Tibia. Die Anzahl der Scolopidien variiert zwischen 7 (*Machilis*) bis zu 300 oder mehr in einigen Orthopteren. Somit scheint es, daß die ringförmige Expression im Übergangsbereich („Gelenk“) Trochanter-Femur durch die Existenz des Chordotonalorgans zustandekommen kann. Besonders ausgeprägt ist die *Dll*-Expression im Trochanter-Femur-Gelenkbereich, wo unter anderem offene Nervenendigungen liegen sollen. Es ist gut möglich, daß dieser Bereich bereits dem proximalen, kompakten Chordotonalorgan zuzuordnen ist, während das andere weiter distal gelegene das sich entwickelnde weitläufigere Chordotonalorgan darstellt. Hiermit übereinstimmend sind auf jeden Fall Größe und Ausprägung der beiden femuralen Nervenzellansammlungen; das mittels der fluoreszenten Färbung sichtbare Nervensystem zeigt eine deutliche Übereinstimmung mit dem mab22C10-markierten Chordotonalorgan von *Drosophila melanogaster* (Halter *et al.*, 1995).

Hinsichtlich der tibialen Strukturen ist die Deutung schwieriger, denn es ist mit den angewendeten Methoden nicht eindeutig zu entscheiden, ob es sich bei den Nervenzellen in der Tibia um die distal-tibialen Strukturen handelt, die in der Nähe des Tibia-Tarsal-Gelenkes münden, oder um das subgenuale Organ (sofern vorhanden); dieses läge eher im proximalen Tibialbereich. Ich halte ersteres jedoch für wahrscheinlicher.

Bislang (und im weiteren folgend) scheinen sich jedoch zwei Zelltypen respektive Areale für die *Dll*-Expression abzuzeichnen:

- 1) in zentralen und peripheren Gliazellen
- 2) in großer Zahl in der Nähe offener Nervenendigungen, beispielsweise in Gelenken

Über die sensorische Ausstattung der Maxillar- respektive Labialpalpen von *Lepisma saccharina* liegen für bestimmte Bereiche detaillierte Beschreibungen vor (Larink, 1978, 1982, 1983; Adel, 1984), für andere wie Lacinia, Galea, Glossa und Paraglossa jedoch nicht. Trotz relativ guter Kenntnis des Sensillenmusters sind die Expressionen nicht leicht zu deuten, insbesondere in den vier proximalen Knospen sowie dem stark *Dll*-exprimierenden Ring zwischen erstem und zweitem Palpusglied. In letztgenanntem finden wir eine Korrelation von „gelenkiger Verbindung zwischen zwei Gliedern“ und „ausgeprägter *Dll*-Expression“ vor, die uns schon in den Antennen und Laufbeinen aufgefallen ist. Ob im Maxillarpalpus ebenfalls ein spezifisch strukturiertes Sinnesorgan wie ein Chordotonalorgan vorhanden ist, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da bislang keine entsprechende Beschreibung vorliegt. Jedoch ähneln die Synorfl-markierten Neuronkonglomerate im Innern der Palpen den femuralen und antennalen Strukturen immens. Und auch die ringförmige Expression ist entsprechend. In Galea, Lacinia, Glossa und Paraglossa finden wir sowohl zentrale Nervennetze als auch zur Oberfläche laufende

Axone, die offenbar dort enden, ob als offenes Nervenende oder in einer Borste. Inwieweit die *Dll*-positiven Zellen in den zwei Paar Knospen axonbegleitende Zellen sind oder die Austrittsstellen an der Oberfläche umgeben wie in den Lateraldornen von *Limulus polyphemus* (siehe unten), konnte mit den angewendeten Methoden nicht festgestellt werden.

Für *Limulus polyphemus* liegen bei weitem nicht so viele und so detailreiche Beschreibungen der Einzelheiten des Nervensystems vor wie für *Lepisma saccharina*. Auch so exakte Darstellungen der Gliazellkategorien und ihrer räumlichen Verteilung fehlen für Xiphosuren. Dennoch kann man aufschlußreiche Korrelationen von neuronalen Strukturen und *Dll*-exprimierenden Zellen feststellen, die mittels der Doppelmarkierung wesentlich prägnanter sind als bei der vorher erwähnten *Dll*-Einzelzellmarkierung. *Dll*-positive Zellen sind in diesen späten Embryonalstadien immer direkt an Axonen oder Konglomeraten von Nervenzellen anliegend.

Über die Funktion des Flabellums besteht nach wie vor Unklarheit, die Funktionsbeschreibungen sind sehr vielfältig; sie reichen von ‚Organ zur Kanalisierung des Wasserstromes an die Kiemen‘ (Barthel, 1974) oder ‚Organ zur Verhinderung, daß Essensreste und Schlamm an die Kiemen geraten‘ über ‚Sensor für respiratorische Reflexe‘ (Waterman & Travis, 1953) und ‚Reinigungsorgan für die Buchkiemen‘ bis zu ‚Chemorezeptor‘ (Hayes, 1971), was mir aufgrund der neuronalen Beschaffenheit am einleuchtendsten erscheint. Eine neurospezifische Funktion scheint das Flabellum auf jeden Fall zu haben, denn insbesondere auf der distalen Hälfte finden sich in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen kurze Sinnesborsten in cuticularen Gruben; Hayes (1971) beschrieb und berechnete 70.000 Sensillen pro Flabellum. Die Synorfl-Expression zeigt im Zentrum der proximalen Hälfte ein bis zwei große traubenförmige Konglomerate von Nervenzellen, deren Axone in mehreren Bündeln fast bis in die Flabellumspitze reichen; dort enden sie in einer Verdickung. Da auch in diesem Fall einige *Dll*-positive Zellen die traubenförmigen Neurone sowie die Axone begleiten, ist es durchaus möglich, daß es sich hierbei um Gliazellen handelt. Nicht erklärt ist jedoch die distinkte *Dll*-Expression in weitgehend allen oberflächlich gelegenen Zellen der distalen zwei Drittel des Flabellums: Festlegung der pd-Achse, Gliazellen an offenen Nervenendigungen oder eine ganz andere Funktion? – Bislang ist keine Entscheidung möglich.

An dieser Stelle bietet sich eine kurze Diskussion über das Flabellum als *Dll*-exprimierender Extremitätenanhang respektive über seinen Ursprung an. Handelt es sich um einen Epipoditen oder einen Exopoditen? Diese Frage ist eng mit der Terminologie und der Homologisierung der basalen Glieder der Arthropodenextremität verknüpft. Unter der Voraussetzung, daß das Flabellum an der Coxa ansetzt, handelt es sich um einen Epipoditen (Snoodgrass, 1952; Mittmann & Scholtz, 2001). Bergström (1969) erwähnt als Ansatz eine Praecoxa und interpretiert das Flabellum deshalb als Praeepipodit. Walossek und Müller (1998) interpretieren jedoch die Coxa als proximalen Enditen, der keineswegs immer ausgeprägt sein muß, und das basale Zentrum der Extremität als Basipoditen; somit wäre das Flabellum ein Exopodit. Da es oft schwierig ist, eine überzeugende Grenze zwischen Basipodit und Coxa festzustellen, empfiehlt es sich, zur Untersuchung dieser

Frage weitere Merkmale hinzuzuziehen, beispielsweise übereinstimmende oder ähnliche Genexpressionsmuster.

Bei *Limulus polyphemus* finden wir eine praemorphogenetische *Dll*-Expression vor dem Auswachsen der Flabellumknospe und eine ausgeprägte Expression während der gesamten Embryonalentwicklung. Bei verschiedenen Crustaceenvertretern sind die *Dll*-Expressionsmuster variabler (siehe auch Zusammenfassung bei Richter 2002). Bei *Artemia salina* wird eine *Dll*-Expression in jeder Beinknospe berichtet (Panganiban *et al.*, 1995; Averof & Cohen, 1997), betrachtet man jedoch die Abbildungen genauer, so sieht man, daß *Dll* in den Enditen, Endopoditen, Exopoditen und proximalen Exiten exprimiert wird (Panganiban *et al.*, 1995), im distalen Epipoditen jedoch nur äußerst schwach (Richter, 2002; siehe Abbildungen in Panganiban *et al.*, 1995; Averof & Cohen, 1997). Bei dem Anostraken *Thamnocephalus platyurus* wird *Dll* stadienspezifisch unterschiedlich exprimiert; in frühen Stadien exprimieren beide Exiten *Dll*, in späteren jedoch geht die Expression im Epipoditen verloren (Williams *et al.*, 2001). Olesen *et al.* (2001) finden in den Epipoditen des Phyllopoden *Cyclestheria hislopi* keinerlei *Dll*-Expression. Auch bei *Triops spec.* konnte keine Expression in den Epipoditen nachgewiesen werden (Williams, 1998). Zusammenfassend kann man festhalten, daß bei den untersuchten Crustaceenvertretern entweder keine oder nur eine temporäre oder eine extrem schwache *Dll*-Expression in den Epipoditen zu finden ist. Richter (2002) zieht dies als Merkmal für die Homologie der Epipoditen von Branchiopoden in Betracht, gibt jedoch zu bedenken, daß die „fehlende“ *Dll*-Expression auch an den fehlenden Setae liegen kann, deren Korrelation mit *Dll*-Expressionen gezeigt wurde (Mittmann & Scholtz, 2001; Williams *et al.*, 2001). Wenn wir jedoch nicht davon ausgehen, daß die *Dll*-Expression ausschließlich neurospezifischer Ursache ist, spricht die ausgeprägte Expression im Flabellum dagegen, daß es sich hierbei um einen Epipoditen handelt. Hingegen wird in allen Exopoditen *Dll* exprimiert, was eher auf die Richtigkeit der Interpretation von Walossek und Müller (1998) deutet. Handelt es sich jedoch bei der Flabellum-Expression tatsächlich ausschließlich um ein Neurospezifikum, können daraus keinerlei Schlüsse auf etwaige Homologisierungen gezogen werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt bleibt noch zu erwähnen, nämlich die praemorphogenetische *Dll*-Expression. Vor dem Auswachsen der Flabellumsknospe finden wir wie bei Extremitäten auch *Dll*-positive Spots aus etlichen Zellen, allerdings nicht nur lateral des 4. Laufbeines, sondern mit Ausnahme der Chelicere lateral jeder Prosomaextremität. In den prosomalen Segmenten anterior des 4. Laufbeines ist die Expression jedoch nur vorübergehend und verschwindet zu dem Zeitpunkt, an dem das Flabellum mit der Ausknosung beginnt. Dieses transiente Muster ähnelt dem Muster im lateralen Mandibelbereich von *Glomeris marginata* und verschiedenen Crustaceen ohne Mandibularpalpus, bei denen diese transiente Expression als genetisches Zeugnis einer ehemals ausgeprägten Knospe (Palpus), die jedoch nicht mehr auswächst, gedeutet wurde (Scholtz *et al.*, 1998). Gleichermäßen scheint die transiente Expression im lateralen Bereich der Prosomaextremitäten ein genetisches Zeugnis für die Existenz eines ehemaligen Exiten zu sein, der mittlerweile mit Ausnahme des Flabellums nicht mehr ausgebildet wird, der aber noch seine Spuren in Form der transienten Expressionen hinterlassen hat, sei es nun ein Exopodit oder ein Epipodit.

Eine ähnliche *Dll*-Expressionssituation wie im Flabellum finden wir im Opisthosoma vor, insbesondere im Bereich der Lateralborsten. Die vom ZNS nach lateral verlaufenden Nervenstränge werden von *Dll*-positiven Zellen begleitet (Gliazellen?). Im Randbereich des Opisthosomas liegen die traubenförmigen Konglomerate von Neuronen. Die von diesen Trauben ausgehenden Axone sind dicht besetzt mit *Dll*-exprimierenden Zellen, die die Axone rundherum umgeben. Dies gilt sowohl für die Axone, die in offenen Nervenendigungen oder synaptischen Endknöpfchen enden, als auch für diejenigen, die in die Lateraldornen hineinziehen. Wiederum spricht hier viel für eine Expression in Gliazellen. Darüber hinaus findet man jedoch direkt an der gelenkigen Verbindung zwischen der beweglichen Lateralborste und dem Opisthosoma einen Bereich mit zahlreichen Zellen, die eine äußerst distinkte *Dll*-Expression zeigen. Hier befinden sich zumindest keine deutlich Synorfl-markierten Axone.

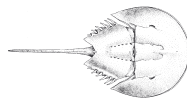
Einer Lösung näher scheinen wir bei den Expressionsbereichen um den Prosomarand herum zu kommen, denn wie beschrieben finden wir auch hier einzelne *Dll*-positive Zellen entlang der Axone, darüber hinaus jedoch regelrechte Nester *Dll*-exprimierender Zellen an der Basis der Borsten – nebenbei wiederum im Bereich der gelenkigen Verbindung von Borstenbasis und Prosomaschild. Warum: Foelix (1970) und Eckweiler (1983) beschrieben, daß die Somata dieser bipolaren Zellen 100-200 µm proximal der Haarbasis liegen. Die Axonen eines sensorischen Haares können alleine in der Hypodermis verlaufen oder sich mit anderen Axonen zu großen Bündeln vereinigen (Foelix, 1985). Eine solche multiple Innervierung, bei der mehrere Dendriten und der Basis eines Haares zusammenstoßen, scheint mindestens für Arachniden typisch zu sein (McIver, 1975). Dies ist ein Unterschied zu Insekten, bei denen die Innervierung vergleichbarer Rezeptoren immer nur einfach ist (McIver, 1975). Doch zurück zu den bipolaren Zellen der Arachniden, denn ihre Axone werden genau von einer oder auch mehreren Hüll- oder Glia-Zellen umgeben (Foelix, 1985), was insbesondere von Interesse ist, da wir ja bereits festgestellt haben, daß zur neuronalen Einheit einer Randborste/eines Conus-Sensillum ungefähr 8-10 Neurone gehören und direkt anliegend 8-12 *Dll*-positive Zellen nachgewiesen werden konnten. Somit spricht auch in diesen Fällen viel für eine *Dll*-Expression in Gliazellen, zumal die Hüllzellen, die die Dendriten der sensorischen Neurone umgeben, den Hüllzellen der Insekten homolog sein sollen (Foelix, 1985).

Allerdings könnte die Expression sowohl an den Borsten des Prosomarandes als auch den opisthosomalen Lateraldornen mit der gelenkigen Verbindung zusammenhängen, denn in diesen häutigen Anteilen bergen sich wiederum offene Nervenendigungen. Hierin finden wir eine Ähnlichkeit zu den Antennen und Laufbeinen von *Lepisma saccharina*, denn wie beim Johnstonschen Organ oder auch bei den femuralen Chordotonalorganen, bei denen immer eine zelluläre Verbindung zu den mit zahlreichen offenen Nervenendigungen versehenen Gelenken vorhanden ist, haben wir auch bei den Lateraldornen eine sehr ausgeprägte Expression im Gelenkbereich. Die genaue Funktion der Lateraldornen ist nicht bekannt, eine sinnesrezeptorische Funktion ist jedoch allein deshalb gewiß, weil sie je mit ungefähr 300 Conus-Sensillen besetzt sind (Fahrenbach, 1999). Da in den stark chitinisierten Anhängen von Arthropoden häufig die Gelenke als Austrittsstelle für Sinnesorgane, insbesondere offene Nervenendigungen, dienen, ist auch hier eine

neurospezifische Funktion von *Dll* wesentlich wahrscheinlicher als eine Beteiligung an einem Ausknospungsprozeß.

Das immer wiederkehrende Bild von Synorfl-markierten Axonen, die von *Dll*-exprimierenden Zellen begleitet und umgeben werden, spricht sehr für eine Expression von *Dll* in Gliazellen. Die Aufgaben von Gliazellen sind sehr vielfältig. Im allgemeinen kennt man sie als Hüllzellen, die der Isolierung von Axonen und darüber hinaus auch ihrer Versorgung dienen. Zusätzlich sind sie ebenfalls an der Kompartimentierung und der Organisation des Axongerüsts im ZNS beteiligt (siehe hierzu unter anderem Tolbert & Ohland, 1989; Jacobs & Goodman, 1989; Goodman & Doe, 1993; Boyan *et al.*, 1995). Dabei nehmen die Gliazellen eine Art Pfadfinderaufgabe ein und dienen auswachsenden Axonen als Wegweiser (Boyan *et al.* 1995; Halter *et al.*, 1995; Reichert & Boyan, 1997), indem sie Proliferationscluster (Neuroblasten, Ganglienmutterzellen und Neurone) umhüllen. Die ersten auswachsenden Axone finden dann entlang dieser Glia-umhüllten Cluster ihren Weg (Boyan *et al.*, 1995). Somit könnte *Dll* auch eine Rolle beim „Axonguidance“ für die Organisation des ZNS spielen. Ob die *Dll*-positiven Zellen bei *Lepisma saccharina* und bei *Limulus polyphemus* eine vergleichbare Rolle spielen, kann mit den hier dargestellten Ergebnissen nicht mit letzter Sicherheit entschieden werden, die vorgelegten Daten sprechen jedoch sehr dafür. Genauere Untersuchungen, beispielsweise mittels Einzelzellmarkierungen, wären wünschenswert.

Mit dieser Arbeit hoffe ich, einen kleinen Teil zu den von D. T. Anderson erwarteten „definitive studies on Xiphosuran embryology“ beigetragen zu haben.



V. LITERATUR

- Abzhanov, A., Kaufman, T.C.** (2000): Homologs of *Drosophila* appendage genes in the patterning of arthropod limbs. *Dev. Biol.* **227**: 1-17.
- Abzhanov, A., Popadic, A., Kaufman, T.C.** (1999): Chelicerate *HOX* genes and the homology of arthropod segments. *Evol. Dev.* **1**: 77-89.
- Adel, T.** (1984): Sensilleninventar und Sensillenmuster auf den Antennen von *Thermobia domestica* und *Lepisma saccharina* (Insecta: Zygentoma). *Braunschw. Naturkund. Schr.* **2**: 191-217.
- Anderson, D.T.** (1973): *Embryology and Phylogeny in Annelids and Arthropods*. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig.
- Averof, M., Cohen, S.M.** (1997): Evolutionary origin of insect wings from ancestral gills. *Nature* **385**: 627-630.
- Ax, P.** (1995): *Das System der Metazoa I*. Fischer, Stuttgart.
- Babu, K.S.** (1965): Anatomy of the central nervous system of arachnids. *Zool. Jb. Anat.* **82**: 1-154.
- Ballard, J.W.O., Olsen, G.J., Faith, D.P., Odgers, W.A., Rowell, D.M., Atkinson, P.W.** (1992): Evidence from 12s ribosomal RNA sequences that Onychophorans are modified arthropods. *Science* **258**: 1345-1348.
- Barber, S.B.** (1956): Chemoreception and Proprioception in *Limulus*. *J. Exp. Zool.* **131**: 51-74.
- Barthel, K.W.** (1974): *Limulus*: A living fossil. Horseshoe crabs and interpretation of an Upper Jurassic environment (Solnhofen). *Naturwissenschaften* **61**: 428-433.
- Bate, C.M.** (1976): Embryogenesis of an insect nervous system 1. A map of the thoracic and abdominal neuroblasts in *Locusta migratoria*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **35**: 107-123.
- Bergström, J.** (1969): Remarks on the appendages of trilobites. *Lethaia* **2**: 395-414.
- Böhm, H., Dybek, E., Heinzl, H.-G.** (2001): Anatomy and in vivo activity of neurons connecting the crustacean stomatogastric nervous system to the brain. *J. Comp. Physiol. A* **187**: 393-403.
- Boore, J.L., Collins, T.M., Stanton, D., Daehler, L.L., Brown, W.M.** (1995): Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. *Nature* **376**: 163-165.
- Boudreaux, H.B.** (1979a): Significance of intersegmental tendon system in arthropod phylogeny and a monophyletic classification of arthropods. In Gupta, A.D. (Hrsg.). *Arthropod phylogeny*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Boudreaux, H.B.** (1979b): *Arthropod phylogeny with special reference to insects*. Wiley, New York.
- Boudreaux, H. B.** (1987): *Arthropod phylogeny with special references to insects*. Krieger, Malabar, Fla.
- Boyan, G., Williams, L., Meier, T.** (1993): Organization of the commissural fibers in the adult and early embryonic brain of the locust. *J. Comp. Neurol.* **332**: 358-377.

- Boyan, G., Therianos, S., Williams, J.L.D., Reichert, H.** (1995): Axogenesis in the embryonic brain of the grasshopper *Schistocerca gregaria*: an identified cell analysis of early brain development. *Development* **121**: 75-88.
- Boyan, G., Williams, L.** (2002): Building the antennal lobe: *engrailed* expression reveals a contribution from protocerebral neuroblasts in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Arthrop. Struct. Dev.* **29**(3): 267-274.
- Boyan, G., Reichert, H., Hirth, F.** (2003): Commissure formation in the embryonic insect brain. *Arthrop. Struct. Dev.* **32**: 61-77.
- Brauer, A.** (1895): Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des Skorpions II. *Z. Wiss. Zool.* **59**: 351-435.
- Brody, T.B.** (1996): The Interactive Fly. Abschnitt « Genes involved in tissue and organ development: Central Nervous System (CNS) – Ventral cord. <http://sdb.bio.purdue.edu/fly/aimorph/cns2.htm>
- Brown, G.G., Clapper, D.L.** (1981): Procedures for Maintaining adults, collecting gametes, and culturing embryos and juveniles of the horseshoe crab *Limulus polyphemus* L. *Marine Invertebrates – Laboratory Animal Management*, pp. 268-290. National academy press, Washington D.C.
- Budd, G.** (1999): Does evolution in body plan patterning genes drive morphological change – or vice versa? *BioEssays* **21**: 326-332.
- Bullock, T.H., Horridge, G.A.** (1965): *Structure and function in the nervous system of invertebrates*, Vol.II. W.H. Freeman and Company, San Francisco and London.
- Campbell, G., Tomlinson, A.** (1998): The roles of the homeobox genes *aristaleless* and *Distal-less* in patterning the legs and wings of *Drosophila*. *Development* **125**: 4483-4393.
- Campos-Ortega, J.A., Hartenstein, V.** (1997): *The embryonic development of Drosophila melanogaster*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Chaboud, F., Seyfarth, E.A., Reichert, H.** (1990): Neuronal development in the spider nervous system. In: Elsner, N., Roth, G. (eds.), *Brain, Perception, Cognition*. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Cohen, S.M.** (1993): Imaginal disc development. In *The Development of Drosophila melanogaster*. M. Bate, A. Martinez (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbour, New York.
- Cohen, S.M., Jürgens, G.** (1989a): Proximo-distal pattern formation in *Drosophila*: cell autonomous requirement for *Distal-less* gene activity in limb development. *EMBO J.* **8** : 1046-1055.
- Cohen, S.M., Jürgens, G.** (1989b): Proximo-distal pattern formation in *Drosophila*: graded requirement for *Distal-less* gene activity during limb development. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **198**: 157-169.
- Cook, C.E., Smith, M.L., Telford, M.J., Bastianello, A., Akam, M.** (2001): *Hox* genes and the phylogeny of the arthropods. *Curr. Biol.* **11** : 759-763.
- Couso, J.P., Bishop, S.A.** (1998): Proximo-distal development in the legs of *Drosophila melanogaster*. *Int. J. Dev. Biol.* **42**: 345-352.
- Damen, W.G.M.** (2002): Parasegmental organization of the spider embryo implies that the parasegment is an evolutionary conserved entity in arthropod embryogenesis. *Development* **129**: 1239-1250.

- Damen, W.G.M., Hausdorf, M., Seyfarth, E.-A., Tautz, D.** (1998): A conserved mode of head segmentation in arthropods revealed by the expression pattern of Hox genes in a spider. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **95**: 10665-10670.
- Damen, W.G.M., Saridaki, T., Averof, M.** (2002): Diverse adaptations of an ancestral gill: a common evolutionary origin for wings, breathing organs, and spinnerets. *Curr. Biol.* **12**: 1711-1716.
- Debaisieux, P.** (1938): Organes scolopideaux des pattes d'insectes. II. *Cellule* **47**: 77-202.
- Debauche, H.** (1936): Étude cytologique et comparée de l'organe de Johnston des insectes. *Cellule* **45**: 77-148.
- Deutsch, J., Guyader, H.** (1998): The neuronal zootype. An hypothesis. *C. R. Acad. Sci. Paris Sci. Vie.* **321**: 713-719.
- Doe, C.Q., Goodman, C.S.** (1985a): Early events in insect neurogenesis. I. Developmental and segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells. *Dev. Biol.* **111**: 193-205.
- Doe, C.Q., Goodman, C.S.** (1985b): Early events in insect neurogenesis. II. The role of cell interactions and cell lineage in the determination of neuronal precursor cells. *Dev. Biol.* **111**: 206-219.
- Dohle, W.** (1964): Die Embryonalentwicklung von *Glomeris marginata* (Villers) im Vergleich zur Entwicklung anderer Diplopoden. *Zool. Jb. Anat.* **81** : 241-310.
- Dohle, W.** (1980): Sind die Myriapoden eine monophyletische Gruppe? Eine Diskussion der Verwandtschaftsbeziehungen der Antennaten. *Verh. Naturwiss. Ver. Hamburg (NF)*: **23**: 45-104.
- Dohle, W.** (1997): Are the insects more closely related to the crustaceans than to the myriapods? *Ent. Scand. Suppl.* **51**: 7-16.
- Dohle, W.** (1998): Myriapod-insect relationships as opposed to an insect-crustacean sister group relationship. In: Fortey, R.-A., Thomas, R.H. (eds.) *Arthropod Relationships*. Chapman & Hall, London.
- Dohle, W.** (2001): Are the insects terrestrial crustaceans? A discussion of some new facts and arguments and the proposal of the proper name "tetraconata" for the monophyletic unit Crustacea + Hexapoda. In Deuve, T. (ed) *Origin of the Hexapoda*. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* **37**: 85-103.
- Dohle, W., Scholtz, G.** (1988): Conal analysis of the crustacean segment: the discordance between genealogical and segmental borders. *Development* **104** Suppl.: 147-160.
- Dove, H., Stollewerk, A.** (2003): Comparative analysis of neurogenesis in the myriapod *Glomeris marginata* (Diplopoda) suggests more similarities to chelicerates than to insects. *Development* **130**(10): 2161-2171.
- Dumont, J.P.C., Wine, J.J** (1987): The telson flexor muscular system of the crayfish. I. Homology with the fast flexor system. *J. Exp. Biol.* **127**: 249-277.
- Eckweiler, W.** (1983): Topographie von Propriozeptoren, Muskeln und Nerven im Patella-Tibia- und Tarsus-Metatarsus-Gelenk des Spinnentieres. Diplomarbeit, Univ. Frankfurt.
- Edgecombe, G.D., Wilson, G.D.F, Colgan, D.J., Gray, M.R., Cassis, G.** (2000): Arthropod cladistics: Combined analysis of histone H3 and U2 snRNA sequences and morphology. *Cladistics* **16**: 155-203.

- Edgecombe, G.D., Giribet, G.** (2002): Myriapod phylogeny and the relationships of Chilopoda. In Llorente Bousquets, J., Morrone, J.J. (Hrsg.) *Bioversidad, Taxonomía y Biografía de Artrópodos de México*. Hacia una Síntesis de su Conocimiento. Prensas de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma, Mexico City.
- Eriksson, B.J., Tait, N.N, Budd, G.E.** (2003): Head development in the Onychophoran *Euperipatoides kanangrensis* with particular reference to the central nervous system. *J. Morphol.* **255**: 1-23.
- Fahrenbach, W.H.** (1999): Merostomata. In: *Microscopic anatomy of invertebrates. Vol. 8a, Chelicerate arthropods*. Harrison, F.W., Foelix, R.W. (Herausgb.). pp. 21-115. Wiley-Liss, New York.
- Foelix, R.F.** (1970): Structure and function of tarsal sensilla in the spider *Araneus diadematus*. *Exp. Zool.* **175**: 99-124.
- Foelix, R.F.** (1985): Sensory nerves and peripheral synaxis. In F.G. Barth (ed), *Neurobiology of Arachnids*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Friedrich, M., Tautz, D.** (1995): Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods. *Nature* **376**: 165-167.
- Garzino, V., Reichert, H.** (1994): Early embryonic expression of a 60-kD glycoprotein in the developing nervous system of the lobster. *J. Comp. Neurol.* **346**: 572-582.
- Gerberding, M.** (1997): Germ band formation and early neurogenesis of *Leptodora kindti* (Cladocera): first evidence for neuroblasts in the entomonstracan crustaceans. *Inv. Repr. Dev.* **32**: 63-73.
- Giangrande, A.** (1994): Glia in the fly wing are clonally related to epithelial cells and use the nerve as a pathway for migration. *Development* **120**: 523-534.
- Giribet, G., Edgecombe, G.D., Wheeler, W.** (2001): Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature* **413**: 157-161.
- González-Crespo, S., Morata, G.** (1996): Genetic evidence for the subdivision of the arthropod limb into coxopodite and telopodite. *Development* **122**: 3921-3928.
- Goodman, C.S., Doe, C.Q.** (1993): Embryonic development of *Drosophila melanogaster* nervous system. In Bate, C.M., Martinez-Arias, A. (Hrsg.) *The development of Drosophila melanogaster*. Pp. 1131-1206. Cold Spring Harboor Laboratory Press, Cold Spring Harboor, New York.
- Goodrich, E.J.** (1897): On the relation of the arthropod head to the annelid prostomium. *Quart. J. Micr. Sci.* **40**: 259-268.
- Gorfinkiel, N., Morata, G., Guerrero, I.** (1997): The homeobox gene *Distal-less* induces ventral appendage development in *Drosophila*. *Gen. Dev.* **11**: 2259-2271.
- Grenier, J.K., Garber, T.L., Warren, R., Whittington, P.M., Carroll, S. B.** (1997): Evolution of the entire arthropod *Hox* gene set predated the origin and radiation of the onychophoran/arthropod clade. *Curr. Biol.* **7**: 547-553.
- Gruner, H.E.** (Hrsg.) (1993): *Arthropoda (ohne Insecta). Lehrbuch der Speziellen Zoologie*, Bd. I, 4. Teil. Gustav Fischer, Jena, Stuttgart, New York.
- Haeckel, E.** (1866): *Allgemeine Entwicklungsgeschichte der Organismen (Generelle Morphologie)*. Bd. II. (Als wörtlicher Abdruck eines Teils des Originals: **Haeckel, E.** (1906): *Prinzipien der generellen Morphologie der Organismen*. Georg Reimer, Berlin.

- Haeckel, E.** (1909): *Natürliche Schöpfungsgeschichte. Gemeinverständliche wissenschaftliche Vorträge über die Entwicklungslehre.* 11. Auflage, Georg Reimer, Berlin.
- Haeckel, E.** (1910): *Anthropogenie oder Entwicklungsgeschichte des Menschen. Keimes- und Stammesgeschichte.* 6. Auflage. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Halter, D.A., Urban, J, Rickert, C., Sarbjit, S.N., Ito, K., Travers, A.A., Technau, G.M** (1995): The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**: 317-332.
- Hanström, B.** (1928): *Das Nervensystem der wirbellosen Tiere.* Springer, Berlin.
- Hartenstein, V., Rudloff, E. Campos-Ortega, J.A.** (1987): The pattern of proliferation of the neuroblasts in the wild-type embryo of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **196**: 473-485.
- Harzsch, S.** (2001): Neurogenesis in the crustacean ventral nerve cord: Homology of neuronal stem cells in Malacostraca and Branchiopoda. *Evol. Dev.* **3**(3): 154-169.
- Harzsch, S., Anger, K., Dawirs, R.R.** (1997): Immunocytochemical detection of acetylated α -tubulin and *Drosophila* synapsin in the embryonic crustacean nervous system. *Int. J. Dev. Biol.* **41**: 477-484.
- Harzsch, S., Dawirs, R.R.** (1994): Neurogenesis in larval stages of the spider crab *Hyas aranaeus* (Decapoda, Brachyura): proliferation of neuroblasts in the ventral nerve cord. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **204**: 93-100.
- Harzsch, S., Miller, J., Benton, J., Dawirs, R., Beltz, B.** (1998): Neurogenesis in the thoracic neuromers of two crustaceans with different styles of metamorphic development. *J. Exp. Biol.* **201**: 2465-2479.
- Harzsch, S., Glötzner** (2002): An immunohistochemical study of structure and development of the nervous system in the brine shrimp *Artemia salina* Linnaeus, 1758 (Branchiopoda, Anostraca) with remarks on the evolution of the arthropod brain. *Arthrop. Struct. Dev.* **30**: 251-270.
- Hayes, W.F.** (1971): Fine structure of the chemoreceptor sensillum in *Limulus*. *J. Morphol.* **133**: 205-239.
- Hayes, W.F., Barber, S.B.** (1967): Proprioceptor distribution and properties in *Limulus* walking legs. *J. Exp. Zool.* **165**: 195-210.
- Henry, L.M.** (1950): The cephalic nervous system of *Limulus polyphemus* Linnaeus (Arthropoda: Xiphosura). *Microentomology* **15**(4): 129-139.
- Hess, W.N.** (1917): The chordotonal organs and pleural discs of cerambycid larvae. *Ann. Ent. Soc. Amer.* **10**: 63-74.
- Heymons, R.** (1897): Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an *Lepisma saccharina* L. *Z. wiss. Zool.* **62**: 583-631.
- Heymons, R.** (1901): Die Entwicklungsgeschichte der Scolopender. *Zoologica* **13**: 1-224.
- Hidalgo, A., Brand, A.** (1997): Targeted neuronal ablation: the role of pioneer neurons in guidance and fasciculation in the CNS of *Drosophila*. *Development* **124**(4): 3253-3262.
- Holmgren, N.** (1916): Zur vergleichenden Anatomie des Gehirns von Polychaeten, Onychophoren, Xiphosuren, Arachniden, Crustaceen, Myriapoden und Insekten. *Vet. Ak. Handl. (Stockholm)* **56**: 1-303.

- Hughes, C.L., Kaufman, T.C.** (2002): Exploring the myriapod bodyplan: expression patterns of the ten Hox genes in a centipede. *Development* **129**: 1225-1238.
- Hwang, U.W., Friedrich, M., Tautz, D., Park, C.J., Kim, W.** (2001): Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. *Nature* **413**: 154-157.
- Iwanoff, P.P.** (1933): Die embryonale Entwicklung von *Limulus moluccans*. *Zool. Jb. Anat.* **56**: 163-348.
- Ito, K., Urban, J., Technau, G.M.** (1994): Distribution, classification and development of *Drosophila* glial cells during late embryogenesis. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **204**: 284-307.
- Jan, L.Y., Jan, Y.N.** (1982): Antibodies to horseradish peroxidase as specific neuronal markers in *Drosophila* and in grasshopper embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 2700-2704.
- Jacobs, J.R., Goodman, C.S.** (1989): Embryonic development of axon pathways in the *Drosophila* CNS II. Behaviour of pioneer axons. *J. Neurosci.* **19**: 2412-2422.
- Johansson, G.** (1933): Beiträge zur Kenntnis der Morphologie und Entwicklung des Gehirns von *Limulus polyphemus*. *Acta Zoologica* **14**: 1-100
- Kaphingst, K., Kunes, S.** (1994): Pattern formation in the visual centers of the *Drosophila* brain: *wingless* acts via *decapentaplegic* to specify the dorsoventral axis. *Cell* **78**: 437-448.
- Kaplan, E., Barlow, R.B., Chamberlain, S., Stelzner, D.J.** (1976): Mechanoreceptors on the dorsal carapace of *Limulus*. *Brain Research* **109**: 615-622.
- Kästner, A.** (1951): Zur Entwicklungsgeschichte von *Thelyphonus caudatus* L. (Pedipalpi). 3. Teil: Die Entwicklung des Zentralnervensystems. *Zool. Jb. Anat.* **71**: 1-55.
- Kennel, J.** (1885): Entwicklungsgeschichte von *Peripatus edwardsi* Blanch. und *Peripatus torquatus* n.sp. *Arb. Zool. Zootom. Inst. Würzburg* **8**: 1-93.
- Kingsley, J.S.** (1890): The ontogeny of *Limulus*. *Zool. Anz.* **13**: 536-539.
- Kingsley, J.S.** (1892): The Embryology of *Limulus*. *J. Morphol.* **7**: 35-68.
- Kingsley, J.S.** (1893): The Embryology of *Limulus*. II. *J. Morphol.* **8** (2): 195-268.
- Kishinouye, K.** (1891): On the development of *Limulus longispina*. *J. Coll. Sci. Univ. Japan* **5**: 53-100.
- Kondoh, Y., Hisada, M.** (1983): Intersegmental to intrasegmental conversion by ganglionic fusion in lateral giant interneurons of crayfish. *J. Exp. Biol.* **107**: 515-519.
- Kondoh, Y., Hisada, M.** (1986): Neuroanatomy of the terminal (sixth) Ganglion of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Cell Tissue Res.* **243**: 273-288.
- Knoll, H.J.** (1974): Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte von *Scutigera coleoptera* L. (Chilopoda). *Zool. Jb. Anat.* **92**: 47-132.
- Kraus, O.** (1998): Phylogenetic relationships between higher taxa of tracheate arthropods. In Fortey, R.A., Thomas, R.H. (Hrsg.) *Arthropod Relationships*. Chapman & Hall, London.
- Kraus, O.** (2001): Phylogenetic system of the Tracheata (Mandibulata): on „Myriapods“ – Insecta interrelationships, phylogenetic age and primary ecological niches. *Verh. Naturwiss. Ver. Hamburg (N.F.)* **34**: 5-31.
- Kraus, O., Kraus, M.** (1994): „Myriapoda“ and the ancestry of Hexapoda. In Deuve, T. (Hrsg.) *Origin of the Hexapoda*. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* **37**: 105-127.
- Larink, O.** (1978): Sensillenmuster auf dem Labium von Lepismatiden (Insecta: Zygentoma). *Zool. Anz.* **201**: 341-352.

- Larink, O.** (1982): Das Sensillen-Inventar der Lepismatiden (Insecta: Zygentoma). Braunschw. Naturkund. Schr. **1**: 493-512.
- Larink, O.** (1983): Embryonic and postembryonic development of Machilidae and Lepismatidae (Insecta: Archaeognatha et Zygentoma). Entomol. Gen. **8**: 119-133.
- Lauterbach, K.-E.** (1973): Schlüsselereignisse der Evolution der Stammgruppe der Euarthropoda. Zool. Beitr. (N.S.) **19**: 251-299.
- Lauterbach, K.-E.** (1980a): Schlüsselereignisse in der Evolution des Grundplans der Mandibulata (Arthropoda). Abh. Naturwiss. Ver. Hamburg (N.F.) **23**: 105-161.
- Lauterbach, K.-E.** (1980b): Schlüsselereignisse in der Evolution des Grundplans der Arachnata (Arthropoda). Abh. Naturwiss. Ver. Hamburg (N.F.) **23**: 163-327.
- Lee, S.E., Jacobs, D.K.** (2000): Expression of *Distal-less* in molluscan eggs, embryos and larvae. Evol. Dev. **1**: 172-179.
- Lowe, C.J., Wray, G.A.** (1997): Radical alterations in the role of the homeobox genes during echinoderm evolution. Nature **389**: 718-721.
- Macagno, E.R.** (1980): Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia. J. Comp. Neurol. **190** : 283-302.
- Mathew, A.P.** (1956): Embryology of *Heterometrus scaber* (Thorell) Arachnida. Zool. Mem. Univ. Travancore **1**: 1-95.
- McIver, S.B.** (1975): Structure of cuticular mechanoreceptors of Arthropods. Ann. Rev. Entomol. **20**: 381-397.
- Meier, T., Reichert, H.** (1990): Embryonic development and evolutionary origin of the Orthopteran auditory organs. J. Neurobiol. **21**: 592-610.
- Minelli, A.** (2000): Limbs and tail as evolutionary diverging duplicates of the main body axis. Evol. Dev. **1**: 157-165.
- Mittmann, B.** (1998): Die Keimstreifbildung und das Expressionsmuster des Homöobox-Gens *Distal-less* bei primär flügellosen Insekten (Collembola, Zygentoma). Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br.
- Mittmann, B.** (2000): Die Keimstreifbildung und das Expressionsmuster des Homöobox-Gens *Distal-less* bei primär flügellosen Insekten (Collembola und Zygentoma). Sber. Ges. Naturf. Freunde Berlin (N.F.) **38**: 93-103.
- Mittmann, B.** (2002): Early Neurogenesis in the Horseshoe Crab *Limulus polyphemus* (Chelicerata, Xiphosura) and its Implication for Arthropod Relationships. Biol. Bull. **203**: 221-222.
- Mittmann, B., Scholtz, G.** (1998): The expression pattern of the homeobox gene *Distal-less* in apterygote insects. Zoology **101** (Suppl. I), 22.
- Mittmann, B., Scholtz, G.** (2001): The expression pattern of the homeobox gene *Distal-less* in the horseshoe crab *Limulus polyphemus* (Chelicerata, Xiphosura) and the silverfish *Lepisma saccharina* (Insecta, Zygentoma): Is *Distal-less* directly correlated with the differentiation of sensory bristles? Zoology **193** (Suppl. III): 11.
- Mittmann, B., Scholtz, G.** (2001): *Distal-less* expression in embryos of *Limulus polyphemus* (Chelicerata, Xiphosura) and *Lepisma saccharina* (Insecta, Zygentoma) suggests a role in the development of mechanoreceptores, chemoreceptores, and the CNS. Dev. Genes Evol. **211**(5): 232-243.

- Mittmann, B., Scholtz, G.** (2003): Development of the nervous system in the „head“ of *Limulus polyphemus* (Chelicerata: Xiphosura): morphological evidence for a correspondance between the segments of the chelicerae and of the (first) antennae of Mandibulata. *Dev. Genes Evol.* **213**: 9-17.
- Mulloney, B., Naranzogt, T., Hall, W.** (2003): Architectonics of crayfish ganglia. *Microsc. Res. Tech.* **60**: 253-265.
- Nassif, C., Noveen, A., Hartenstein, V.** (1998): Embryonic development of the *Drosophila* brain. I. Pattern of pioneer tracts. *J. Comp. Neurol.* **402**: 10-31.
- Niwa, N., Saitoh, M., Ohuchi, H., Yoshioka, H., Noji, S.** (1997): Correlation between *Distal-less* expression patterns and structures of appendages in development of the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zool. Sci. (Tokyo)* **14**: 115-125.
- Olesen, J., Richter, S., Scholtz, G.** (2001): The evolutionary tranformation of phyllopodous to stenopodous limbs in the Branchiopoda (Crustacea) – Is there a common mechanism for earls limb development in arthropods? *Int. J. Dev. Biol.* **45**: 869-876.
- Packard, A.S.** (1873): Further observations on the embryology of *Limulus* with notes on its affinities. *Amer. Nat. Vol.* **9**: 422-424.
- Panganiban, G, Nagy, L., Carroll, S.B.** (1994): The role of the *Distal-less* gene in the development and evolution of insect limbs. *Curr. Biol.* **4**: 671-675.
- Panganiban, G., Sebring, A., Nagy, L., Carroll, S.B.** (1995): The development of crustacean limbs and the evolution of arthropods. *Science* **270**: 1363-1366.
- Panganiban, G., Irvine, S.M., Lowe, C., Roehl, H., Corley, L.S., Sherbon, B., Grenier, J.K., Fallon, J.F., Kimble, J., Walker, M., Wray, G.A., Swalla, B.J., Martindale, M.Q., Carroll, S.B.** (1997): The origin and evolution of animal appendages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5162-5166.
- Panganiban, G.** (2000): *Distal-less* function during *Drosophila* appendage and sense organ development. *Dev. Dynam.* **218**: 554–562.
- Panganiban, G., Rubenstein, J. L. R** (2002): Developmental functions of the *Distal-less/Dlx* homeobox genes. *Development* **129**: 4371-4386.
- Pappenheim, P.** (1903): Beitrag zur Kenntnis der Entwicklungsgeschichte von *Dolmedes fibriatus* Clerk, mit besonderer Berücksichtigung der Bildung des Gehirns und der Augen. *Z. Wiss. Zool.* **74**: 109-154.
- Parsons, D.L., Harris, K.-L., Turner, K., Whittington, P.M.** (2003): roundabout gene family functions during sensory axon guidance in the *Drosophila* embryo are mediated by both Slit-dependent and Slit-independent mechanism. *Dev. Biol.* **264**: 363-375.
- Pasakony, J.W.** (1994): Nature versus nurture: asymmetric cell divisions in *Drosophila* bristel development. *Cell* **76**: 477-491.
- Patten, W.** (1989): Segmental sense organs of arthropods. *J. Morphol.* **2**: 600-602.
- Patten, W.** (1890): On the Origin of vertebrates from Arachnids. *Quart. J. Micr. Sci.* **31**: 317-378.
- Patten, W.** (1893): On the morphology and physiology of the brain and sense organs of *Limulus*. *Quart. J. Micr. Sci.* **35**: 1-96.
- Patten, W.** (1912): *The Evolution of Vertebrates and their Kin*. P. Blaksiton's Son & Co, Philadelphia.

- Patten, W., Redenbaugh, W.A.** (1899): Studies on *Limulus* II. The nervous system of *Limulus polyphemus*, with observations upon the general anatomy. J. Morphol. **16**: 91-200.
- Paulus, H.F.** (1979): Eye structure and the monophyly of the Arthropoda. In Gupta, A.D (Hrsg.) *Arthropod phylogeny*. Van Nostrand Reinhold, New York, London.
- Pflugfelder, O.** (1948): Entwicklung von *Paraperipatus anboinensis* n.sp. Zool. Jb. Anat. **69**: 443-492.
- Popadic, A., Panganiban, G., Rusch, D., Shear, W.A., Kaufman, T.C.** (1998): Molecular evidence for the ganthobasic derivation of arthropod mandibles and for the appendicular origin of the labrum and other structures. Dev. Gen. Evol. **208**: 142-150.
- Pross, A.** (1966): Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte der Araneae (*Pardosa hortensis* (Thorell)) unter besonderer Berücksichtigung des vorderen Prosomaabschnittes. Z. Morph. Ökol. Tiere **58**: 38-108.
- Pross, A.** (1977): Diskussionsbeitrag zur Segmentierung des Cheliceraten-Kopfes. Zoomorphologie **86**: 183-196.
- Prpic, N.M., Tautz, D.** (2003): The expression of the proximodistal axis patterning genes *Distal-less* and *dachshund* in the appendages of *Glomeris marginata* (Myriapoda: Diplopoda) suggests a special role of these genes in patterning the head appendages. Dev. Biol. **260**: 97-112.
- Reichert, H., Plummer, M.R., Hagiwara, R., Roth, R.L., Wine, J.** (1982): Local interneurons in the terminal abdominal ganglion of the crayfish. J. Comp. Physiol. **149**: 145-162.
- Reichert, H., Boyan, G.** (1997): Building a brain: developmental insights in insects. TINS **20**: 258-264.
- Remane, A.** (1956): *Die Grundlagen des natürlichen Systems, der vergleichenden Anatomie und der Phylogenetik*. Akademische Verlagsanstalt, Greest and Portig, Leipzig.
- Remane, A., Storch, V., Welsch, U.** (1973): *Evolution - Tatsachen und Probleme der Abstammungslehre*. Deutscher Taschenbuchverlag GmbH & Co. KG, München.
- Remane, A., Storch, V., Welsch, U.** (1989): *Kurzes Lehrbuch der Zoologie*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- Richter, S.** (2002): The Tetraconata concept: hexapod-crustacean relationships and the phylogeny of Crustacea. Org. Divers. Evol. **2**: 217-237.
- Rogers, B.T., Kaufman, T.C.** (1997): Structure of the insect head in ontogeny and phylogeny: a view from *Drosophila*. Int. Rev. Cytol. **174**: 1-84.
- Romeis, B.** (1989): *Mikroskopische Technik*. 17. Auflage, P. Böck (ed.), Urban und Schwarzenberg, München.
- Sandeman, D., Sandeman, R., Derby, C., Schmidt, M.** (1992): Morphology of the brain of crayfish, crabs, and spiny lobsters: a common nomenclature for homologous structures. Biol. Bull. **183**: 304-326.
- Sarhage, D.** (1954): Ökologische Untersuchungen an *Thermobia domestica* (Packard) und *Lepisma saccharina* L. Z. wiss. Zool. **157**: 77-168.
- Scholl, G.** (1977): Beiträge zur Embryonalentwicklung von *Limulus polyphemus* L. (Chelicerata, Xiphosura). Zoomorphologie **86**: 99-154.

- Scholtz, G.** (1990): The formation, differentiation and segmentation of the post-naupliar germ band of the amphipod *Gammarus pulex* L. (Crustacea, Malacostraca, Peracarida). *Proc. R. Soc. Lond. B* **239**: 163-211.
- Scholtz, G.** (1992): Cell lineage studies in the crayfish *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda): germ band formation, segmentation, and early neurogenesis. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **202**: 36-48.
- Scholtz, G.** (1995): Expression of the *engrailed* gene reveals nine putative segment-anlagen in the embryonic pleon of the freshwater crayfish *Cherax destructor* (Crustacea, Malacostraca, Decapoda). *Biol. Bull.* **188**: 157-165.
- Scholtz, G.** (1997): Cleavage, germ band formation and head segmentation: the ground pattern of the Eurarthropoda. In Fortey, R.A., Thomas, R.H. (Hrsg.), *Arthropod Relationships*. Chapman & Hall, London.
- Scholtz, G.** (2001): Evolution of developmental patterns in arthropods – the analysis of gene expression and its bearing on morphology and phylogenetics. *Zoology* **103**: 99-111.
- Scholtz, G., Mittmann, B., Gerberding, M.** (1998): The pattern of *Distal-less* expression in the mouthparts of crustaceans, myriapods and insects: new evidence for the gnathobasic mandible and the common origin of Mandibulata. *Int. J. Dev. Biol.* **42**: 801-810.
- Schwartz, V.** (1973): *Vergleichende Entwicklungsgeschichte der Tiere*. Georg Thieme, Stuttgart.
- Sekiguchi, K., Yamamichi, Y., Costlow, J.D.** (1982): Horseshoe crab developmental studies I. Normal embryonic development of *Limulus polyphemus* compared with *Tachypleus tridentatus*. *Physiology and Biology of Horseshoe Crabs: Studies on Normal and Environmentally Stressed Animals*. pp. 53-73. Alan R. Liss, New York.
- Sekiguchi, K.** (1988): *Biology of Horseshoe Crabs*. Science House, Tokyo.
- Shain, D.H., Ramirez-Weber, F.A., Hsu, J., Weisblat, W.A.** (1998): Gangliogenesis in leech: morphogenetic processes leading to segmentation in the central nervous system. *Dev. Genes. Evol.* **208**: 28-36.
- Sink, H., Whittington, P.M.** (1991): Pathfinding in central nervous system and periphery by identified embryonic *Drosophila* motor axons. *Development* **112**: 307-316.
- Siewing, R.** (1963): Zum Problem der Arthropodenkopfsegmentierung. *Zool. Anz.* **170**: 429-468.
- Snodgrass, R.E.** (1952): *Arthropod Anatomy*. Comstock Publishing Associates, Ithaca New York. pp. 20-40.
- Snodgrass, R.E.** (1958): Evolution of arthropod mechanisms. *Smithson. Misc. Collect.* **148** (2): 1-77.
- Stent, G.S.** (1985): The role of cell lineages in development. *Phil. Trans. Royal. Soc. London.* **312**: 3-19.
- Stent, G.S.** (1998): Developmental cell lineage. *Int. J. Dev. Biol.* **42**: 237-241.
- Stollewerk, A.** (2002): Recruitment of cell groups through Delta/Notch signalling during spider neurogenesis. *Development* **129**: 5339-5348.
- Stollewerk, A., Weller, M., Tautz, D.** (2001): Neurogenesis in the spider *Cupiennius salei*. *Development* **128**: 2673-2688.

- Stollewerk, A., Tautz, D., Weller, M.** (2003): Neurogenesis in the spider: new insights from comparative analysis of morphological processes and gene expression patterns. *Arthrop. Struct. Dev.* **32**: 5-16.
- Sullivan, J.M., MacMillan** (2001): Embryonic and postembryonic neurogenesis in the ventral nerve cord of the Freshwater Crayfish *Cherax destructor*. *J. Exp. Zool.* **290**: 49-60.
- Sweetman, H.L.** (1938): Physical ecology of the firebrat *Thermobia domestica* (Packard). *Ecol. Monogr.* **8**: 285-311.
- Tabin, C.J., Carroll, S.B., Panganiban, G.** (1999): Out on a limb: parallels in vertebrate and invertebrate limb patterning and the origin of appendages. *Amer. Zool.* **39**: 650-663.
- Tamarelle, M., Haget, A., Ressouches, A.** (1985): Segregation, division, and early patterning of lateral thoracic neuroblasts in the embryo of *Carausius morosus* Br. (Phasmida, Lonchodidae). *Int. J. Morphol. & Embryol.* **14** (5): 307-317.
- Telford, M., Thomas, R.H.** (1998): Expression of homeobox genes shows chelicerate arthropods retain their deutocerebral segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **95**: 10671-10675.
- Thomas, R.H., Telford, M.** (1999): Appendage development in embryos of the oribatid mite *Archegozetes longisetosus* (Acari, Oribatei, Thrypochthoniidae). *Acta Zool. (Stockholm)* **80**: 193-200.
- Tiegs, O.W.** (1940): The embryology and affinities of the Symphyla, based on a study of *Hanseniella agilis*. *Q. J. Microsc. Sci.* **82**: 1-225.
- Tiegs, O.W.** (1947): The development and affinities of the Pauropoda, based on a study of *Pauropus silvaticus*. *Quart. J. Microsc. Sci.* **88**: 165-267, 275-336.
- Tolbert, L.P., Ohland, L.A.** (1989): A role for glia in the development of organized neuropilar structures. *TINS* **12** : 70-75.
- Viallanes, M.H.** (1893): Etudes histologiques et organologiques sur les centres nerveux et les organes de sens des animaux articulés. *Ann. des Sciences natur. Serv. VII, Zoo.* **14**: 405-456.
- Walossek, D. Müller, K.J.** (1998): Cambrian “Orsten”-type arthropods and the phylogeny of Crustacea. In Fortey, R.A., Thomas, R.H. (Hrsg.), *Arthropod Relationships*. Chapman & Hall, London.
- Waterman, T.H., Travis, D.H.** (1953): Respiratory Reflexes and the flabellum of *Limulus*. *J. Coll. Comp. Physiol.* **41**: 261-290.
- Wegerhoff, R., Breidbach, O.** (1995): Comparative aspects of the chelicerate nervous system. In: Breidbach, O., Kutsch, W. (Hrsg.), *The nervous system of Invertebrates: An evolutionary and comparative approach*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Weygoldt, P.** (1965): Vergleichend-embryologische Untersuchungen an Pseudoskorpionen III. *Neobisium muscorum*. *Z. Morphol. Ökol. Tiere* **55**: 321-382.
- Weygoldt, P.** (1975): Untersuchungen zur Embryologie und Morphologie der Geißelspinne *Tarantula marginemaculata* C.L. Koch (Arachnida, Amblypygi, Tarantulidae). *Zoomorphology* **82**: 137-199.
- Weygoldt, P.** (1979): Significance of later embryonic stages and head development in arthropod phylogeny. In Gupta, A.D. (Hrsg.), *Arthropod phylogeny*. Van Nostrand Reinhold, New York, London.

- Weygoldt, P.** (1985): Ontogeny of the arachnid central nervous system. In Barth, F.G. (Hrsg.), *Neurobiology of Arachnids*. Springer Verlag Berlin.
- Whittington, P.M.** (1996): Evolution of neural development in arthropods. *Sem. Cell Dev. Biol.* **7**: 605-614.
- Whittington, P.M., Meier, T., King, P.** (1991): Segmentation, neurogenesis and formation of early axonal pathways in the centipede, *Ethmostigmus rubripes* (Brandt). *Roux's Arch. Dev. Biol.* **199**: 349-363.
- Whittington, P.M., Leach, D., Sandeman, R.** (1993): Evolutionary change in neural development within the arthropods – axogenesis in the embryo of two crustaceans. *Development* **118**: 449-461.
- Whittington, P.M., Harris, K.-L., Leach, D.** (1996): Early axogenesis in the embryo of a primitive insect, the silverfish *Ctenolepisma longicaudata*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **205**: 272-281.
- Whittington, P.M., Bacon, J.P.** (1998): The organization and development of the arthropod ventral nerve cord: insights to arthropod relationships. In Fortey, R.A., Thomas, R.H. (Hrsg.), *Arthropod Relationships*. Chapman & Hall, London.
- Wiersma, C.A.G.** (1957): On the number of nerve cells in a crustacean nervous system. *Acta Physiol. Pharmacol. Neederland* **6**: 135-142.
- Williams, T.A.** (1998): *Distalless* expression in crustaceans and the patterning of branched limbs. *Dev. Genes Evol.* **207**: 427-434.
- Williams, T.A., Nagy, L.M.** (1996): Comparative limb development in insects and crustaceans. *Semin. Cell Dev. Biol.* **7**: 615-628.
- Williams, T.A., Nulsen, C., Nagy, L.M.** (2001): A complex role for Distal-less in Crustacean Appendage Development. *Dev. Biol.* **241**: 302-312.
- Winter, G.** (1980): Beiträge zur Morphologie und Embryologie des vorderen Körperabschnitts (Cephalosoma) der Pantopoda Gerstaecker, 1863. Teil I. *Z. zool. Syst. Evolut.-Forsch.* **18**: 27-61.
- Yoshikura, M.** (1955): Embryological studies on liphistiid spider, *Heptathela kimurai*, part II. *Kumamoto J. Sci. B.* **2**: 1-86.
- Zrzavý, J., Štys, P.** (1997): The basic body plan of arthropods: insights from evolutionary morphology and developmental biology. *J. Evol. Biol.* **10**: 353-367.

VI. DANKSAGUNG

Für die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit bin ich etlichen Kollegen zu Dank verpflichtet.

An erster Stelle möchte ich **Prof. Dr. Gerhard Scholtz** (Berlin) für die Überlassung des hochinteressanten Themas und die vielen hilfreichen Diskussionen danken. Durch diese äußerst spannende Arbeit bekam ich einen tieferen Einblick in die faszinierende Welt der Pfeilschwanzkrebse, die mich mein weiteres Leben nicht mehr loslassen werden.

Prof. Dr. Robert B. Barlow (Syracuse, Woods Hole, USA) half mir während der drei Paarungssaisons von *Limulus polyphemus* bei der zeitintensiven Suche der frisch abgelegten Eier, stellte mir ungefragt während meiner Aufenthalte in Woods Hole Platz in seinem beengten Labor zur Verfügung und war mir bei allen anfallenden kleinen und großen Schwierigkeiten in Woods Hole eine Art „Sesam-öffne-Dich“.

Rudi Rottenfusser und seine Zeiss-Gruppe am MBL (Woods Hole) waren insbesondere während meiner 3,5monatigen Forschungszeit als Grass-Fellow am MBL Tag und Nacht bereit, in aller Ruhe technische Fragen zu beantworten und die Geräte mit dem individuell optimalen Zubehör auszustatten.

Dr. Andreas Mölich (HU-Berlin) und **Ekkehard Richter** (HU-Berlin) halfen bei den ersten Schritten am LSM.

Dr. Michael Schäfer (FU-Berlin) ließ mich während eines reparaturbedingten Mikroskop-Engpasses an der Humboldt-Universität die letzten Monate der Datenerhebung großzügig und unbürokratisch am LSM seiner Arbeitsgruppe arbeiten. Ohne diese Kollegialität wären die Darstellungen der *Dll*/Synorfl-Doppelmarkierungen nicht zustandegekommen.

Der *Distal-less* Antikörper war ein Geschenk von Prof. Dr. Grace Panganiban (Wisconsin, USA).

Prof. Dr. Erich Buchner (Würzburg) überließ mir während der drei Jahre mehrfach den Synorfl-Antikörper als Geschenk.

Bei allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Vergleichende Zoologie bedanke ich mich für die zahlreichen anregenden Diskussionen während der Jahre und für die gute Kooperation im Labor.

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Scho442/7-1, Scho442/7-2) unterstützt.

Die Grass-Foundation for Neuroscience gewährte mir im Sommer 2002 ein mehrmonatiges Forschungsstipendium (Grass Fellowship) am Marine Biological Laboratory (Woods Hole, Massachusetts, USA).

Lebenslauf

- Geboren am 25.09.1966 in Tübingen
- 1972 bis 1985 Besuch der Grundschule und des humanistischen Uhland-Gymnasiums Tübingen
- 1986 Abitur auf dem Wenzinger-Gymnasium in Freiburg i. Br.
- Oktober 1987 bis Oktober 1990 Studium der Informatik an der Universität Karlsruhe
- Oktober 1990 bis Oktober 1991 Arbeit als Sales-Manager bei der Firma Luxemburger Computers in Freiburg
- November 1991 Beginn des Studiums der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Oktober 1992 Wechsel an die Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
- Juni 1997 Abschluß der Diplom-Prüfungen (Note: 1,2)
- Oktober 1997 bis Oktober 1998 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Gerhard Scholtz an der Humboldt-Universität zu Berlin über „Die Keimstreifbildung und das Expressionsmuster des Homoeobox-Gens *Distal-less* bei primär flügellosen Insekten (Collembola, Zygentoma) (Note: 1,1). Ausgezeichnet mit dem Katharina-Heinroth-Preis 1999 der Gesellschaft der Naturforschenden Freunde zu Berlin
- 1998/1999 Übersetzung aus dem Englischen und redaktionelle Betreuung des Werkes „Humans before Humanity – Menschen vor *Homo sapiens*“ des Paläoanthropologen Prof. Dr. Robert A. Foley (Cambridge, UK) für den Jan Thorbecke Verlag (2000)
- Juli 1999 Beginn der von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Dissertation über „Die Entwicklung des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* (Xiphosura, Chelicerata) und weiterer Arthropoden unter besonderer Berücksichtigung der Neurogenese“
- Seit Januar 2003 Tätigkeit als Study Data Manager zur Betreuung medizinisch-pharmazeutischer Studien bei Hoffmann-La Roche, Basel

Weitere Wissenschaftliche Tätigkeiten

- Mai/Juni 2000 Gastwissenschaftler am Marine Biological Laboratory (MBL) in Woods Hole (Massachusetts, USA) auf Einladung von Prof. Dr. Robert B. Barlow und am Lehrstuhl für Neurowissenschaften des Wellesley-College (Boston) auf Einladung von Prof. Dr. Barbara Beltz
- Mai/Juni 2001 Gastwissenschaftler am Marine Biological Laboratory (MBL) in Woods Hole (Massachusetts, USA) auf Einladung von Prof. Dr. Robert B. Barlow
- Mitwirkung an der Fernsehreportage (arte) über Pfeilschwanzkrebse: „Fossil mit blauem Blut“ (ausgestrahlt im Juni 2001 und im Dezember 2001)
- Mai bis September 2002 Gastwissenschaftler am Marine Biological Laboratory (MBL) in Woods Hole (Massachusetts, USA) als Stipendiat der „Grass Foundation for Neuroscience“
 - First award winner of the MBL/Zeiss Photo contest 2002 „Scientific Imaging“
 - First award winner at the MBL „General Scientific Meeting 2002“ for graduate students talks.

- Zahlreiche Vorträge auf Einladung verschiedener naturwissenschaftlicher Einrichtungen u.a.
 - Vortrag “Der Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* - ein lebendes Fossil in der modernen Forschung” (September 2001, Zoo Leipzig)
 - Vortrag “Der Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* - ein lebendes Fossil in der modernen Forschung” (April 2002, Jura-Museum, Eichstätt)
 - Vortrag “Geißelspinnen und Skorpione - Spannende Paarungstänze bei Spinnentieren” (Oktober 2002, Zoo Leipzig)
 - Vortrag „Faszinierende Welt der Insekten“ (Oktober 2003, Zoo Leipzig)

Veröffentlichungen

- **Peschke, K., Fuldner, D., Mittmann, B.** (1996): *A. clavicornis*, a stepping stone in the evolution of parasitoid behaviour in the rove beetles genus *Aleochara* (Coleoptera: Staphylinidae). Abstr.XX.Intern.Congr.Entomol., Firenze.
- **Mittmann, B.** (1997): Rezension über: Bense, U. (1995): Longhorn Beetles, Illustrated Key to the Cerambycidae and Vesperidae of Europe (Markgraf Verlag). Mitteilungen des badischen Landesverbandes für Naturkunde und Naturschutz, 3/4, 653f.
- **Mittmann, B., Scholtz, G.** (1998): The expression pattern of the homeobox gene *Distal-less* in apterygote insects. *Zoology*, 101 (Suppl.I), 22.
- **Scholtz, G., Mittmann, B., Gerberding, M.** (1998): The pattern of *Distal-less* expression in the mouthparts of crustaceans, myriapods and insects: new evidence for a gnathobasic mandible and the common origin of Mandibulata. *International Journal of Developmental Biology* 42: 801-810.
- **Maus, C., Mittmann, B., Peschke, K.** (1998): Host record of parasitoid *Aleochara* Gravenhorst species (Coleoptera: Staphylinidae) attacking puparia of cyclorrhapheous Diptera. *Deutsche Entomologische Zeitschrift* 45 (2): 231 – 254.
- **Robert Foley** (2000): Menschen vor *Homo sapiens*. Wie und warum unsere Art sich durchsetzte. Aus dem Englischen übertragen von **Beate Mittmann**. Herausgegeben und mit einem Geleitwort von Wighart v. Koenigswald. Thorbecke SPECIES Band 5.
- **Mittmann, B.** (2000): Die Keimstreifbildung und das Expressionsmuster des Homoeobox Gens *Distal-less* bei primär flügellosen Insekten (Collembola, Zygentoma). *Sitzungsberichte der Naturforschenden Freunde Berlin (N.F.)* 38: 93-103.
- **Mittmann, B., Scholtz, G.** (2000): The expression pattern of the homeobox gene *Distal-less* in the horseshoe crab *Limulus polyphemus* (Chelicerate, Xiphosura) and the silverfish *Lepisma saccharina* (Insecta, Zygentoma): Is *Distal-less* directly correlated with the differentiation of sensory bristles? *Zoology* 193 (Suppl. III): 11.
- **Mittmann, B., Scholtz, G.** (2001): *Distal-less* expression in embryos of *Limulus polyphemus* (Chelicerata, Xiphosura) and *Lepisma saccharina* (Insecta, Zygentoma) suggests a role in the development of mechanoreceptors, chemoreceptors, and the CNS. *Development Genes and Evolution* 211(5): 232-243.
- **Errigo, M., Mc Guinness, C., Meadors, S., Mittmann, B., Dodge, F., Barlow, R.** (2001): Visually guided behaviour of juvenile horseshoe crabs. *Biol. Bull.* 201: 271-271.
- **Mittmann, B.** (2002): Early Neurogenesis in the Horseshoe Crab *Limulus polyphemus* (Chelicerata, Xiphosura) and its Implication for Arthropod Relationships. *Biol. Bull.* 203: 221-222.
- **Mittmann, B., Scholtz, G.** (2003): Development of the nervous system in the „head“ of *Limulus polyphemus* (Chelicerata: Xiphosura): morphological evidence for a correspondance between the segments of the chelicerae and of the (first) antennae of Mandibulata. *Dev. Genes Evol.* 213: 9-17.
- **Scholtz, G., Braband, A., Tolley, L., Reimann, A., Mittmann, B., Lukhaup, C., Steuerwald, F., Vogt, G.** (2003): Parthenogenesis in an outsider crayfish. *Nature*: 421: 806.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der hier angeführten Hilfsmittel durchgeführt habe.

Basel, den 12.12.2003

Beate Mittmann

Film 1 (Film1_S4_Spots_Hemisegment; *Limulus polyphemus*, TRITC-Phalloidin): Die Aufnahme eines Hemisegmentes zeigt deutlich, die Anordnung der Immigrationszentren in Säulen und Reihen. Fokussiert man durch das Hemisegment hindurch (von ventral nach dorsal), findet man dorsal der fluoreszenten Spots die flaschenförmigen Zellen in „blümchenähnlicher“ Formation.

Film2 (Film2_S4_Spots_Hemisegment_Ausschnitt; *Limulus polyphemus*, TRITC-Phalloidin): Die Vergrößerung zweier Immigrationszentren zeigt nochmals deutlich die „blümchenförmige“ Anordnung der Flaschenzellen. Im dorsalen Bereich des Immigrationszentrums entwickelt sich bereits Neuropil.

Film 3 (Film3_S4_Spots_Neuropil_3D, *Limulus polyphemus*, TRITC-Phalloidin): In der 3D-Aufnahme eines Hemisegmentes sieht man, wie weit die Zellfortsätze der flaschenförmigen Zellen ins Innere des Embryos hineinreichen. Sie ergeben die fluoreszenten Spots auf der Ventralseite des Embryos.

Film 4 (Film4_S4S5_ZNS, *Limulus polyphemus*, α -Tubulin): Die Fokus-Aufnahme (von ventral nach dorsal) durch den Embryo verdeutlicht nochmals den Aufbau des embryonalen ZNS. Je weiter man in dorsaler Richtung fokussiert, desto mehr wird das sich einstülpende Stomodaeum an anterioren Bereich zur Landmarke. Um dieses herum verläuft der für Arthropoden typische circumoesophageale Neuropilring. In den einzelnen Segmenten sieht man einen mächtigen Nervenstrang aus dem Ganglionbereich austreten, der die Extremitäten innerviert; er spaltet sich rasch in drei (und später mehr) Zweige auf. Anterior jedes dieser Nervenstränge verläuft der Intestinalnerv in anterolaterale Richtung.

Film 5 (Film5_S5_Gehirn; *Limulus polyphemus*, α -Tubulin): Beim Fokussieren durch das Gehirn kann man die einzelnen Gehirnstrukturen genau verfolgen. Deutlich sieht man die prominenten paarigen optischen Loben ans anteriorste ZNS-Struktur. Median der optischen Loben liegen die mächtigen Medianloben. In diesem Bereich nehmen die zwei Faserstränge, die nach anterior verlaufen und die Medianaugen innervieren, ihren Ursprung. Auch die beiden am weitesten anterior verlaufenden Intestinalnerven sind zu prominenten Strängen ausgewachsen.

Film 6 (Film6_Lateraldornen_Dll_Synorfl, *Limulus polyphemus*, Dll/Synorfl): Die Doppelmarkierung zeigt einerseits die Nervenfasern (rot), andererseits die Dll-exprimierenden Zellen (grün). Die Nervenfasern sind von Dll-exprimierenden Zellen umgeben, insbesondere sieht man dies an dem Strang, der in die Lateraldornen hineinlaufen. Gleichzeitig findet man immer wieder Nervenendigungen, die in einer Art Verdickung auslaufen. Diese Verdickungen sind von größeren Ansammlungen Dll-positiver Zellen umgeben. Häufig umgeben die Dll-positiven Zellen diese Nervenendigungen in „blümchenähnlicher“ Anordnung. Ein auffallend große Ansammlung Dll-exprimierender Zellen findet man im Bereich der gelenkigen Verbindung von Lateraldorne und Opisthosoma.